

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 84 | Número 1 | Enero-Marzo 2018 | Páginas 1-115



www.analesranf.com

ISSN 1697-4271



REAL ACADEMIA
NACIONAL DE
FARMACIA



Instituto
De España



Ministerio de
Educación
Cultura y Deporte

Publicación científica electrónica trimestral

Madrid, Spain



Role of microvesicles as biomarkers and future pharmacology targets of cardiovascular diseases

Title in Spanish: *Papel de las microvesículas como biomarcadores y futuras dianas farmacológicas de enfermedades cardiovasculares*

Julia Carracedo^{1,2,*}, Isabel Corpas¹, Matilde Alique³, Rafael Ramírez-Carracedo⁴, Rafael Ramírez³

¹Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, España. ²Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, España. ³Departamento Biología de Sistemas, Unidad Fisiología, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España. ⁴Unidad de Investigación Conjunta Cardiovascular, Universidad Francisco de Vitoria/Unidad de Investigación Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS), Madrid, España.

ABSTRACT: In the 1990's, it was discovered a new cell-cell communication system based on the action of vesicles that cargo bioactive molecules, on neighboring cells. These vesicles, known as extracellular vesicles (EVs) act as regulators of several physiological processes but also participate in the development and progression of multiple diseases. Microvesicles (MVs) are types of EVs that are implicated in the etiopathogenesis of a large number of cardiovascular diseases due to they take part in the onset of atherosclerosis. Different cardioprotective drugs have shown to have an effect on MVs. In addition, since the discovery that MVs are capable of transferring biological information, the use of them as drug delivery vehicles has gained scientific interest. The aim of this work is to analyze the involvement of MVs in the origin of atherosclerosis to demonstrate their role as diagnostic biomarkers, as well as to review the pharmacological effect of current therapies on MVs and their role as therapeutic tool.

RESUMEN: En la década de los 90 se descubrió un nuevo sistema de comunicación célula-célula a través de vesículas con moléculas bioactivas liberadas al espacio extracelular. Estas vesículas, conocidas como vesículas extracelulares (VE), actúan como reguladores de procesos fisiológicos, pero también participan en el desarrollo y progresión de múltiples patologías. Las microvesículas (MVs) son un tipo de VE que se producen como resultado del daño celular, y están implicadas en la etiopatogenia de un gran número de enfermedades cardiovasculares porque intervienen en el inicio de la aterosclerosis. Diferentes fármacos cardioprotectores han demostrado tener un efecto sobre las MVs; por otro lado, desde que se conoce su capacidad para transferir información biológica, el uso de las éstas como vehículos de suministro molecular ha adquirido interés científico. El objetivo de este trabajo es analizar la implicación de las MVs en la etiopatogenia de la aterosclerosis estableciendo su importancia como biomarcadores de diagnóstico y de seguimiento. Se revisará el efecto farmacológico de las terapias actuales sobre las MVs y se discutirá su papel como herramienta terapéutica

*Corresponding Author: julcar01@ucm.es

Received: March 2, 2018 Accepted: March 6, 2018

Premio Real Academia Nacional de Farmacia en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 1 (2018), pp. 4-15

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

En 1949 se describió por primera vez que las células liberaban pequeñas estructuras con membrana. En un principio se consideraron restos celulares sin función biológica producidos como consecuencia del metabolismo celular de excreción. Sin embargo, recientemente numerosos investigadores han determinado que las microvesículas tienen un papel muy importante en la comunicación y el intercambio de información entre células.

El principal objetivo de este trabajo es profundizar en

el papel de las microvesículas como posible biomarcador de enfermedades cardiovasculares y revisar su posible papel como herramienta terapéutica.

2. VESÍCULAS EXTRACELULARES

2.1. Definición

Inicialmente se consideró que cualquier partícula presente en el organismo con un tamaño $< 5 \mu\text{m}$ era un residuo procedente de células muertas sin ningún efecto sobre otras células. Sin embargo, investigaciones más recientes evidencian que estos restos celulares, ya

clasificados como vesículas, y en especial aquellos cuyo diámetro está comprendido entre 40 a 1000 nm, no son necesariamente productos resultantes de muerte celular, sino que pueden ser producidos por las células de forma activa y regulada y ejercen funciones biológicas (1). Estas vesículas juegan un papel clave en la comunicación intercelular siendo capaces de causar cambios estructurales y funcionales en las células con las que interaccionan y, consecuentemente, en los tejidos (2).

La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) recomienda utilizar el término “vesículas extracelulares” (VE) para referirse a todo tipo de vesículas del medio extracelular (3). Desde su descubrimiento hace 30 años, se ha demostrado que las VE son producidas por una gran variedad de células: células sanguíneas, dendríticas, endoteliales y epiteliales, células del sistema nervioso, células madre adultas y embrionarias e incluso células tumorales (4).

En general, las VE se pueden encontrar en muchos fluidos corporales, incluidos el plasma y la orina, e intervienen en procesos fisiológicos y fisiopatológicos participando como mediadores en la comunicación intercelular (4, 5). En el contexto fisiológico, las VE actúan como mecanismo de comunicación paracrina y/o endocrina (6), pues tienen la capacidad de transmitir señales biológicas a células vecinas bien: (I) por contacto directo, mediante la unión a ligandos presentes en la superficie de la célula diana y/o enzimas asociadas a la membrana, así activando de cascadas de señalización; o bien, (II) entregando o liberando su contenido directamente al citoplasma por transferencia de una serie de moléculas (proteínas de membrana y citosólicas, lípidos, ADN, ARN mensajero, microARN y ARN no codificado) tras un proceso de fusión o internalización (7, 8). De este modo, se ha descrito que las VE influyen sobre diversos procesos fisiológicos entre los que se incluyen la regulación de la homeostasis celular, la regulación de la coagulación, la angiogénesis y la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria. En el momento que tiene lugar un daño como es el estrés oxidativo, que conlleva activación o apoptosis celular, la producción y liberación de VE se incrementa, y se produce una modificación del contenido vesicular (9). Conjuntamente, estas modificaciones influyen en el desarrollo y la progresión de enfermedades; pero a su vez, funciona como sistema de alerta a células adyacentes, células progenitoras y células del sistema inmune, siendo las células progenitoras las únicas con capacidad protectora o regeneradora (4).

En cuanto al desarrollo y progresión de enfermedades,

se ha demostrado que los factores ambientales influyen en el número y contenido de las VE. Las VE se encuentran elevadas en pacientes con enfermedades vasculares, metabólicas, pulmonares, autoinmunes, neurodegenerativas, en la inflamación crónica y en el cáncer (10). Por ejemplo, en la aterosclerosis, debido al estrés al que se ven sometidas las células del endotelio vascular, se genera un incremento de un tipo específico de VE responsables de la evolución de la lesión (3), por lo que, la utilización de VE como marcadores para la predicción, diagnóstico, pronóstico y monitorización de terapias de enfermedades complejas resulta cada vez más atractiva, así como su potencial para identificar nuevas dianas terapéuticas (3).

2.2. Clasificación de las VE

En función del tamaño, morfología, composición bioquímica y mecanismo de liberación, se han identificado tres tipos de VE (2) (**Figura 1**):

Las vesículas extracelulares de menor tamaño son los **exosomas** (30-100 nm). Su formación y liberación tiene lugar a través de la vía endosomal; es decir, en el interior de la célula estas vesículas se agrupan formando cuerpos multivesiculares (MVBs) que se liberan al medio extracelular tras fusionarse con la membrana plasmática. Su contenido corresponde al existente en el compartimento endosomal por lo que su membrana presenta poco o nada de fosfatidilserina (PS) (4).

El segundo tipo son las conocidas como **microvesículas (MVs)**, también denominadas micropartículas (MPs), tienen un tamaño entre 100 nm-1 µm. Son secretadas fuera de la célula por un proceso de evaginación o *sprout* de la membrana plasmática, que implica: (I) una reubicación de los fosfolípidos en la membrana externa; de manera que la PS, normalmente localizada en el lado interno de la membrana, queda expuesta en la superficie de la vesícula, (II) reordenamiento del citoesqueleto, (III) generación de la curvatura de la membrana y (IV) liberación de la vesícula (9, 11).

El tercer tipo de VE son los **cuerpos apoptóticos**, con un tamaño aproximado de 1-5 µm. Son liberados como vesículas tras producirse la apoptosis celular seguido de aumento de la permeabilidad de la membrana, fragmentación del ADN y, finalmente, cambios en el potencial de la membrana mitocondrial. Los cuerpos apoptóticos también exponen PS en su superficie (9) y además, contienen orgánulos celulares así como material genético en su interior (6, 12).

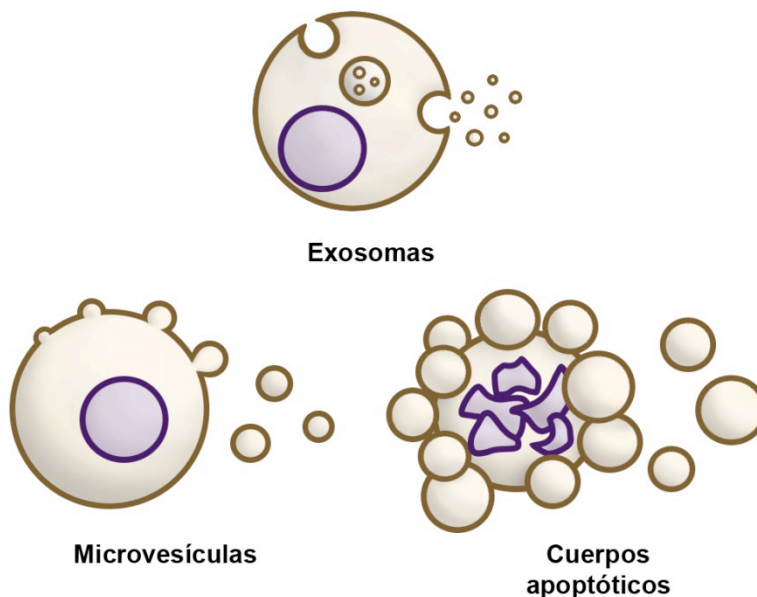


Figura 1. Proceso de formación y liberación de vesículas extracelulares (9). Las células pueden secretar tres tipos de vesículas extracelulares en función de su tamaño, morfología, composición bioquímica y mecanismo de liberación. Estos tres tipos son: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos.

3. MICROVESÍCULAS

Las MVs son partículas esféricas rodeadas por una membrana lipídica en cuya superficie puede haber: (I) moléculas de adhesión transmembrana específicas de la célula de origen como integrinas, selectinas y cadherinas, que median las interacciones célula-célula o de la célula

con la matriz extracelular (13), (II) ligando CD40, (III) metaloproteinasas (MMPs) y (IV) factor tisular (FT) (3, 9) implicado en las primeras etapas de la coagulación al formar complejos con el factor VII/VIIa que conducen al inicio de la cascada de coagulación (**Figura 2**).

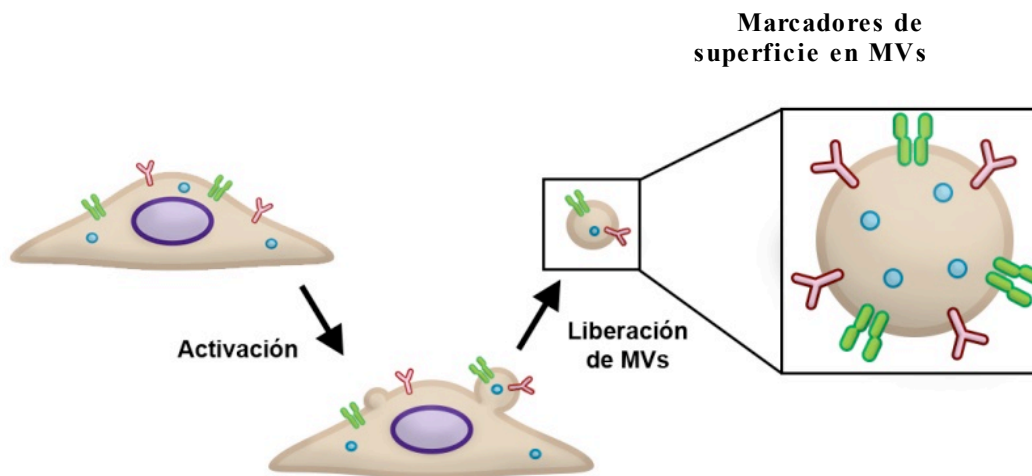


Figura 2. Características de las microvesículas (13). Las células se activan mediante diferentes estímulos, tanto fisiológicos como patológicos, y como consecuencia liberan microvesículas al medio extracelular. Estas microvesículas se caracterizan por transportar en su interior diferente contenido, entre el que se encuentran: proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Además, estas microvesículas expresan en su membrana diferentes marcadores de superficie (proteínas y fosfatidilserina).

Su formación y liberación a la circulación sanguínea, desde un punto de vista cualitativo (fenotipo) y cuantitativo (cantidad), depende tanto de la célula de origen, como del estímulo responsable de la liberación (9, 12); pero también de factores externos como la edad o el

sexo (9). Como ya se ha explicado, durante su formación se produce un cambio en la asimetría de la bicapa lipídica de tal forma que quedan expuestos en la superficie de la membrana fosfolípidos con carga negativa como la PS, que actúan como lugar de unión de los factores de

coagulación II, Va y Xa y, además, proporcionan un lugar para el montaje del complejo protombinasa. Esto es de gran importancia, ya que aceleran la conversión de protrombina en trombina favoreciendo el fenómeno de coagulación lo que aumenta el riesgo de formación de coágulos (11).

A nivel del sistema cardiovascular, un gran número de células secretan MVs a sangre; entre ellas, las células sanguíneas (leucocitos y eritrocitos) y las plaquetas, las células endoteliales y las células musculares lisas vasculares (8). La posibilidad de aislar las MVs de fluidos humanos, ha permitido observar niveles elevados de éstas en individuos con diversas afecciones cardiovasculares que se encuentran asociadas a disfunción endotelial (4). Además, existe una relación directa entre el incremento de

MVs en sangre y parámetros moleculares de diagnóstico de enfermedades que cursan con complicaciones vasculares (8); incluso se ha demostrado una asociación entre el Índice de Riesgo Framingham, utilizado para predecir el riesgo de enfermedad cardiovascular, y las concentraciones plasmáticas de MVs de los diversos orígenes celulares (leucocitos, plaquetas y células endoteliales) (14). Dependiendo del origen celular, se pueden subdividir tipos de subpoblaciones de MVs que difieren entre ellas, no solo en el contenido y los antígenos expuestos en su membrana que vienen determinados por el estímulo desencadenante de la liberación, sino también en la participación en el desarrollo y progresión de enfermedades (**Tabla 1**) (9)

Tabla 1. Tipos de microvesículas y su participación en la progresión de enfermedades.

Vesículas extracelulares	Papel en la progresión y desarrollo de enfermedades
MVPs	Coagulación, trombosis, procesos inflamatorios y progresión de tumores
MVEs	Aumento del estrés oxidativo, disfunción endotelial, angiogénesis, y crecimiento tumoral
MVs derivadas de leucocitos	Disfunción endotelial, inflamación vascular y sepsis

MVPs: Vesículas extracelulares derivadas de plaquetas; **MVEs:** Vesículas extracelulares derivadas de células endoteliales.

Alrededor del 70-90% del total de las MVs en sangre son aquellas derivadas de plaquetas (**MVPs**) (15). Interaccionan con las células sanguíneas y endoteliales e intervienen en la regulación de la función endotelial, pero principalmente participan en el proceso de coagulación (7). Cuando se produce disfunción endotelial, las plaquetas tienden a adherirse a la superficie dañada, generándose así una activación plaquetaria que consiste en la agregación de plaquetas y en la secreción de gránulos internos, lo que conlleva una translocación de la selectina P a la membrana plasmática, liberación de MVPs e inicio de la actividad pro-coagulante. Como consecuencia, las plaquetas liberan potentes factores mitogénicos tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), que conducen a la proliferación de las células del músculo liso y progresión de la lesión (16).

Por otro lado, la activación endotelial conlleva una liberación de MVs de células endoteliales al espacio extracelular, que se conocen como vesículas extracelulares endoteliales (**MVEs**), en un proceso de evaginación (4). Las MVEs que constituyen una pequeña subpoblación del total de las MVs, y su papel fundamental es servir como sistema de señalización entre los elementos que participan en la función y la homeostasis del vaso (15). Se ha postulado que las MVEs pueden estar implicadas en la etiopatogenia de varias enfermedades cardiovasculares, principalmente aquellas que derivan de una disfunción endotelial como la aterosclerosis.

Las MVs derivadas de leucocitos, que son aquellas que pueden originarse a partir de monocitos (**MVMs**), neutrófilos y linfocitos B y T, contienen mediadores pro-coagulantes y pro-inflamatorios por lo que son de especial importancia en procesos de disfunción endotelial y sepsis (17).

Se han detectado niveles plasmáticos elevados de MVs en pacientes con factores de riesgo cardiovascular (diabetes, hipertensión, enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca) y en individuos que han sufrido eventos trombóticos como infarto de miocardio agudo y accidente vascular cerebral (7). Diferentes estudios han demostrado que ciertos tratamientos farmacológicos dirigidos a estas patologías, disminuyen los niveles de MVs (14). Por esta razón, las MVs están emergiendo como un candidato prometedor en el diagnóstico clínico y una posible alternativa en el control para el seguimiento terapéutico, al actuar como biomarcadores por su implicación en la disfunción endotelial y la activación de la coagulación (9).

4. FUNCIONES DE LAS MVS SOBRE LOS PROCESOS VASCULARES

4.1. Microvesículas y estrés oxidativo

Las MVs procedentes de diversos orígenes como las células endoteliales, monocitos y linfocitos son capaces de promover el estrés oxidativo en el endotelio a través de procesos que pueden implicar varios sistemas enzimáticos (18). Las MVs tienen capacidad para regular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), aunque existen

ciertas discrepancias con respecto a los sistemas de generación de ROS afectados. Estos resultados contradictorios pueden deberse a que las poblaciones de MVs estudiadas son de diferente origen o se han producido frente a diferentes estímulos. Estas diferencias en la producción de MVs tienen un interés potencial para poder definir poblaciones de MVs con diferentes actividades biológicas. Concretamente, la respuesta celular generando MVs podría ser diferente frente a un estrés oxidativo agudo, por ejemplo en el caso de una inflamación aguda, o bien ante una situación crónica como es un proceso de senescencia (19, 20).

4.2. Microvesículas y coagulación

La actividad trombogénica de las MVs está estrechamente relacionada con el FT. Este factor, del que depende la activación de la cascada de coagulación, está ausente en las células en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, como consecuencia de un daño celular se produce una exposición del FT, sobre todo, en células endoteliales y monocitos. Varios estudios *in vitro* han demostrado la presencia de FT en la superficie de la membrana de MVs en determinadas situaciones patológicas como el síndrome coronario agudo (3).

La presencia de fosfolípidos con carga negativa, en particular de PS, en la superficie de las MVs contribuye a su potencial pro-coagulante pues es un potente promotor de la coagulación ya que atrae diferentes factores de coagulación y permite el montaje del complejo protombinasa (13).

Las MVPs y, seguidamente, las MVEs son responsables principalmente de esta actividad trombogénica (21). Estas últimas, promueven la coagulación mediante la generación de trombina a través del factor VII y el FT (7), y mediante la unión de plaquetas activadas a través del receptor de selectina P. De hecho, se ha reportado que la interacción receptor-ligando en las MVs contribuye al desarrollo de trombos en ratones (21). También las MVPs se adhieren al subendotelio donde activan a las células endoteliales. El resultado es que favorecen el reclutamiento de plaquetas en la zona dañada, favoreciendo la formación de trombos locales y la aterogénesis, y contribuyendo al progreso de la lesión (3).

4.3. Microvesículas y su relación con la inflamación y la aterosclerosis

La exposición de las células a diferentes estímulos como son el estrés oxidativo, la presencia de agonistas endógenos o factores pro-apoptóticos, o bien una lesión celular, provoca la liberación de MVs a la sangre, lo que contribuye al daño endotelial y al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (5).

El endotelio es uno de los principales objetivos de estas MVs circulantes. La respuesta endotelial a ellas puede ser una liberación de diferentes factores (respuesta aguda) o un cambio en la expresión de genes (respuesta prolongada). En condiciones normales, las MVs participan en la regulación de las funciones de las células endoteliales, incluyendo la coagulación y la inflamación.

Bajo situaciones de estrés, algunas células liberan MVs que difieren en número, composición y función, y que pueden ser responsables de la modificación del tono vascular, lo que llevará a la disfunción endotelial, la amplificación de la respuesta inflamatoria y al desarrollo de trombosis intravascular, desencadenando el desarrollo de patologías cardíacas (5). Es importante señalar que la inflamación crónica focalizada conduce a la fase de aterosclerosis, siendo esta la fase final del proceso de envejecimiento endotelial. Mediadores inflamatorios tales como el TNF- α , la interleuquina-1 β (IL-1 β) y la trombina intervienen la generación y liberación de MVs (13) que, a su vez, actúan sobre las células endoteliales favoreciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias y promoviendo una mayor inflamación vascular (14).

La placa de ateroma contiene grandes cantidades de MVs, lo que sugiere una producción a nivel local (14). Al aislarlas, se ha visto que a) participan en la regulación de la respuesta inflamatoria en células endoteliales, b) aumentan la adhesión de monocitos al endotelio y c) favorecen la migración sub-endotelial, promoviendo la progresión de la lesión aterosclerótica.

El efecto que tienen las MVPs ha sido ampliamente estudiado. Su papel se extiende más allá de su participación en la coagulación y es que, las MVPs tienen acción sobre la pared vascular, ya que se adhieren tanto a las células endoteliales lesionadas como al sub-endotelio a través del receptor de glicoproteína (GP) IIb/IIIa presente en la membrana de éstas. *In vitro* se ha visto que la estimulación del endotelio por las MVPs da lugar a la liberación de citoquinas e interleuquinas como IL-6 e IL-8 y al aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular como la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), y la E-selectina. Además, las MVPs contienen suficiente cantidad de la quimioquina CCL-5/RANTES, proteína con actividad pro-inflamatoria capaz depositarse sobre el endotelio activado, como para promover el reclutamiento de leucocitos en la placa aterosclerótica y, posteriormente, inducir progresión de la aterosclerosis (17). Las MVPs también transfieren ácido araquidónico a las células endoteliales y éste a su vez, induce la producción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) e ICAM-1. El ácido araquidónico se metaboliza a tromboxano A2, que provoca la contracción vascular (17).

Las MVs derivadas de leucocitos también actúan a nivel endotelial como agonistas inflamatorios al estimular la liberación de citoquinas, IL-6 e IL-8, y la expresión de moléculas de adhesión. En el estudio realizado Wang *et al.*, se observó que las MVMs son capaces de activar las células endoteliales porque contienen IL-1 β responsable de intensificar el proceso inflamatorio (17).

En definitiva, las MVs no sólo son reflejo del estado de activación de las células, sino que también confieren una mayor actividad inflamatoria sistémica, siendo causa y consecuencia de la inflamación vascular.

4.4. *Microvesículas en la disfunción endotelial y angiogénesis*

Las MVs modifican la función del endotelio vascular al originar estrés oxidativo y reducir las concentraciones de óxido nítrico en las células endoteliales. Las MVEs a pesar de constituir una pequeña proporción en sangre, presentan una estrecha relación con el origen de varias enfermedades cardiovasculares, fundamentalmente porque participan en el inicio de la disfunción endotelial (17, 22).

Se ha visto que las MVEs en pacientes con infarto de miocardio, diabetes, preclampsia, síndrome metabólico o apnea (8), son capaces de actuar a nivel de la síntesis, liberación y acción del óxido nítrico y como consecuencia, modifican el tono vascular (5); este efecto pueden producirlo al inhibir reversiblemente la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) y/o al disminuir la biodisponibilidad de óxido nítrico a nivel celular. También, pueden atenuar la biodisponibilidad del óxido nítrico al actuar como estímulo de la formación de ROS, alterando así la función endotelial normal (21). Las MVEs se caracterizan porque producen cantidades significativas de aniones superóxido y radicales libres mediante la fosforilación a través de la vía de señalización dependiente de las quinasas PI3K/ERK, al contener la enzima NADPH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa) (5), que son responsables de que las MVEs actúen aumentando la nitración de proteínas en las células endoteliales e intensificando el estrés oxidativo (14).

Brodsky *et al.*, observaron que las MVEs causan relajación de la pared vascular de la aorta en ratas; este efecto está asociado a la producción de aniones superóxido en el anillo aórtico y a la reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico (18).

La acumulación de MVs en la placa aterosclerótica representa una señal de neo-vascularización y vulnerabilidad (3) ya que las MVs presentan propiedades angiogénicas. Para ello es necesario la activación y la expresión de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (3). Este proceso es clave en la transición de lesión estable a inestable; de hecho, la formación de nuevos vasos sanguíneos aumenta el riesgo de ruptura de la placa y favorece las hemorragias (13).

En general, las diferentes MVs se caracterizan por tener propiedades pro- y anti-angiogénicas. Por un lado, las MVs derivadas de plaquetas son capaces de estimular la proliferación, supervivencia, migración y formación de nuevos capilares en el endotelio a través del VEGF. Por otro lado, las MVs derivadas de células endoteliales promueven la degradación de la matriz extracelular (contienen metaloproteasas) y la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de un mecanismo que implica la vía de señalización PI3K/Akt (4). Leroyer *et al.*, demostraron que las MVs CD40 positivas pueden aumentar la proliferación endotelial, al promover la formación de nuevos vasos *in vivo* lo que favorece la

hemorragia intra-placa (13, 21). Además de sus características pro-angiogénicas, se ha visto que las MVEs así como las MVs derivadas de leucocitos también inhiben la angiogénesis porque estimulan la síntesis de ROS y disminuyen los niveles de óxido nítrico (3).

4.5. *Microvesículas, apoptosis y senescencia*

Además de ser un potente estímulo para la formación de MVs, la apoptosis también puede ser una consecuencia de la señalización de MVs (23). Las VEs derivadas de monocitos, eritrocitos, células endoteliales y plaquetas contienen caspasa 3. Se piensa que el contenido de caspasas puede ser un mecanismo dirigido al control de la apoptosis, y se sugiere que las MVs liberarían la caspasa 3 en las células diana, participando en la inducción de apoptosis. Además de la muerte celular, la caspasa 3 está implicada en numerosos procesos celulares, por lo que la liberación de caspasa puede tener un impacto todavía mayor sobre la célula diana. Además, las MVEs podrían actuar a otros niveles conducentes al proceso de apoptosis y relacionados con el estrés y el daño celular y genómico. Por ejemplo, la metilación del ADN, la modificación de histonas y la regulación post-transcriptional del ARN pueden ser algunos procesos epigenéticos implicados (24). Recientemente, se ha demostrado que las MVs pueden jugar un importante papel en procesos de senescencia celular (25), ya que se han propuesto como elementos de respuesta endotelial que pueden participar en los procesos dañinos y reparadores del endotelio (26-28).

4.6. *Microvesículas endoteliales y regeneración vascular*

Inicialmente, la proliferación y migración de células endoteliales adyacentes se habían identificado como un factor de reparación endotelial. Estudios posteriores describen un mecanismo para el mantenimiento de la estructura endotelial que se asocia con la capacidad de células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs) para diferenciar y reparar el tejido endotelial dañado. Debido a la importancia de este mecanismo de reparación daño-endotelial en el mantenimiento de la homeostasis vascular, es lógico pensar en la existencia de una estrecha comunicación entre las células endoteliales dañadas y las EPCs. Algunos estudios indican que las MVEs de plasma, tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad renal crónica, participan sobre la actividad de las EPCs (26). De hecho, la hipótesis que se plantea es que las MVEs pueden ser un importante y necesario mecanismo fisiológico de señalización para iniciar el reclutamiento de células reparadoras de endotelio desde la médula ósea. En modelos *in vitro* se ha demostrado que las MVEs pueden ser un elemento clave en la regeneración y mantenimiento de la homeostasis vascular actuando sobre células EPCs (29).

4.7. *Microvesículas endoteliales y calcificación vascular*

La calcificación vascular es un proceso cada vez más frecuente en los países desarrollados y puede contribuir de manera importante a un incremento del riesgo cardiovascular. Los procesos y mecanismos que participan

en la formación de calcificaciones vasculares son poco conocidos y es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir o revertir la calcificación.

Los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) tienen una mayor frecuencia de calcificación vascular, y las MVEs se encuentran incrementadas en pacientes con un mayor grado de calcificación (26). Además, en estudios *in vitro*, las MVEs producidas en un entorno inflamatorio o que proceden de pacientes con ERC promueven la calcificación de células de músculo liso *in vitro* (30). Varios autores han descrito un papel de las MVs en la mineralización de células de músculo liso vascular (31, 32).

5. MICROVESÍCULAS COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Los biomarcadores son una herramienta analítica que puede ser utilizada como indicador de función biológica, de procedimientos patógenos o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica característica objetivamente medible y evaluable. Comúnmente, permiten identificar individuos con alto riesgo patológico, diagnosticar enfermedades y tratar a los pacientes (16). Como la evaluación directa del estado biológico puede ser muy invasiva y/o costosa, los biomarcadores son de significativa utilidad clínica a la hora de evaluar el riesgo y/o identificar patologías. Además, permiten una detección temprana y llevar a cabo una intervención terapéutica antes de que la patología progrese de forma irreversible o se agrave (3).

Las MVs presentan diversas propiedades que las hacen responsables del inicio y la progresión de enfermedades cardiovasculares, así como de la aparición de complicaciones (14). Al secretarse bajo condiciones de estrés o daño celular se han convertido en un candidato interesante para ser utilizados como biomarcador no invasivo y potencialmente sensible de enfermedades cardiovasculares, pues reflejan el grado de activación o apoptosis de plaquetas, leucocitos, eritrocitos y células endoteliales (3, 9). Por esta razón, medir sus concentraciones en sujetos con enfermedades cardiovasculares se ha propuesto no solo para diagnosticar la entidad clínica, sino también para evaluar la gravedad y evolución de ésta (9).

Con el fin de demostrar que el incremento del número de MVs en sangre es indicativo de riesgo cardiovascular

(21) y que, por tanto, demostrar que las MVs pueden usarse como biomarcadores de actividad en el desarrollo clínico temprano (14), los niveles de MVs de referencia deben establecerse de forma independiente a otros factores de riesgo. Esta independencia ha sido demostrada, aunque se ha visto que existe una correlación entre los elevados valores de MVs en sangre encontrados en enfermedades tales como diabetes, obesidad, hipertensión, etc. (21). Además, se han demostrado elevadas concentraciones plasmáticas de MVs en una variedad de estados patológicos, en particular, en pacientes que padecen aterosclerosis asociada a lesión vascular, inflamación y estado pro-trombótico (3).

Mezentsev *et al.*, llevaron a cabo un ensayo *in vitro* mediante el cual cuantificaron los niveles fisiológicos de MVEs en individuos sanos, encontrando valores comprendidos entre 10^3 - 10^4 MVEs/mL; mientras que la concentración de MVEs en individuos con enfermedad cardiovascular eran de 10^5 MVEs/mL (22).

En individuos sanos, las MVs derivan principalmente de plaquetas y, en menor medida, de leucocitos y células endoteliales (5). En individuos con afectación cardiovascular se han observado distintos fenotipos de MVs en sangre. Otros autores han descrito niveles elevados de MVs derivadas de plaquetas, eritrocitos y células endoteliales en individuos con síndrome metabólico respecto a individuos sanos; Sabatier *et al.*, observaron un aumento de los niveles de MVs derivadas de plaquetas y células endoteliales en pacientes con Diabetes Mellitus (DM) Tipo 1 (22). Recientemente Carmona *et al.*, han publicado que los niveles de MVs, se encuentran elevados en pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis, fundamentalmente diabéticos, y que este número va a determinar la mortalidad de causa cardiovascular (33).

La mayoría de los estudios que analizan los efectos biológicos de las MVs en la aterogénesis y sus complicaciones se han realizado *in vitro*, utilizando MVs producidas a partir de células tratadas con estímulos inflamatorios o apoptóticos; o bien MVs aisladas *ex vivo* de sangre o placas ateroscleróticas. Cabe destacar que, como hemos comentado anteriormente, las propiedades que presentan son muy diferentes según dos parámetros: el tipo de célula de origen y el estímulo utilizado para generarlos (14).

Tabla 2. Resumen de diferentes estudios clínicos en relación con las microvesículas.

Estudio (Autores)	Tipo VEs	Resultado	Referencia
Agouni <i>et al.</i> Helal <i>et al.</i>	MVPs, MVEs y VEs de eritrocitos	Niveles plasmáticos elevados en individuos con Síndrome Metabólico	(8)
Sabatier <i>et al.</i>	MVPs y MVEs	Niveles plasmáticos elevados en pacientes con DM1	(22)
Mezentsev <i>et al.</i>	MVEs	Niveles en voluntarios sanos: 10^3 - 10^4 MVEs/mL; en individuos con ECV: 10^5 MVEs/mL	(17, 22)
Katopodis <i>et al.</i> Mallat <i>et al.</i>	MVPs y MVEs	Niveles dos veces mayores en individuos con IAM y angina inestable	(22)
Koga <i>et al.</i>	MVEs	Niveles aumentados en voluntarios con DM y ECV. Marcador de aterosclerosis indicativo de disfunción endotelial.	(22)
Shiro <i>et al.</i>	MVEs	Niveles significativamente elevados en pacientes con sintomatología de enfermedad cardiaca	(21)
Nozaki <i>et al.</i>	MVs	Aumento de los niveles, indicativo de riesgo cardiovascular	(3)
DISFUNCIÓN ENDOTELIAL y ANGIOGÉNESIS			
Brodsky <i>et al.</i>	MVEs	Causan relajación de la pared vascular de la aorta en ratas	(18)
Leroyer <i>et al.</i>	MVs	Aumentan la proliferación endotelial por su acción sobre angiogénesis	(13, 21)
Szotowski <i>et al.</i>	MVEs	Relación entre formación de ROS y MVEs El uso de antioxidantes disminuye formación de ROS y de MVEs	(22)
Lozito y Tuan	MVEs	Capacidad de activar Ves de plaquetas lo que evidencia la capacidad de las VEs en inducir la degradación de la matriz; importante durante la angiogénesis y aterosclerosis	(14)
MEDIADOR PROINFLAMATORIO			
Wang <i>et al.</i>	MVEs	Contienen IL-1 β responsable de intensificar el proceso inflamatorio	(17)
ACTIVIDAD TROMBOGÉNICA			
Shiro	MVs de leucocitos	Inestabilidad de la placa aterosclerótica	(21)
Leroyer <i>et al.</i>	MVs de placa de ateroma	Potencial trombogénico	(13)

DM: Diabetes Mellitus; **ECV:** Enfermedad cardiovascular; **IAM:** Infarto Agudo de Miocardio; **ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno; **MMP:** metaloproteinasas.

6. MICROVESÍCULAS EN EL ÁMBITO TERAPÉUTICO

Hemos explicado repetidamente que las MVs participan en las etiopatogenias de múltiples enfermedades cardiovasculares, particularmente en el inicio de la aterosclerosis (14). Por ello, existe un gran interés en evaluar los cambios que se producen en los niveles de MVs en respuesta a un tratamiento farmacológico (8). Por un lado, existe la posibilidad de actuar a nivel de la producción y liberación de MVs. El inconveniente es que los mecanismos celulares que intervienen en ambos procesos no están completamente claros por lo que aún no es posible dirigir estos procesos (8).

Aun así, varios fármacos anti-ateroscleróticos o algunos nutrientes dietéticos son capaces de dirigir su

acción terapéutica hacia MVs de diferente origen celular en sangre y mostrar un efecto protector cardiovascular (3). La reducción de los niveles del total de MVs o de una subpoblación específica, puede ser indicativo de la eficacia de un tratamiento o de la regresión de la enfermedad (34). También, una modulación de los niveles de MVs por la acción de un fármaco podría disminuir los efectos deletéreos inducidos por éstas (8).

Por otro lado, es importante resaltar que las MVs ofrecen una gran información de las posibles moléculas que pueden ser susceptibles de funcionar como dianas farmacológicas. Su contenido puede modificarse para contener las proteínas o genes activos deseados para dirigirse al sistema cardiovascular (3) (**Figura 3**).

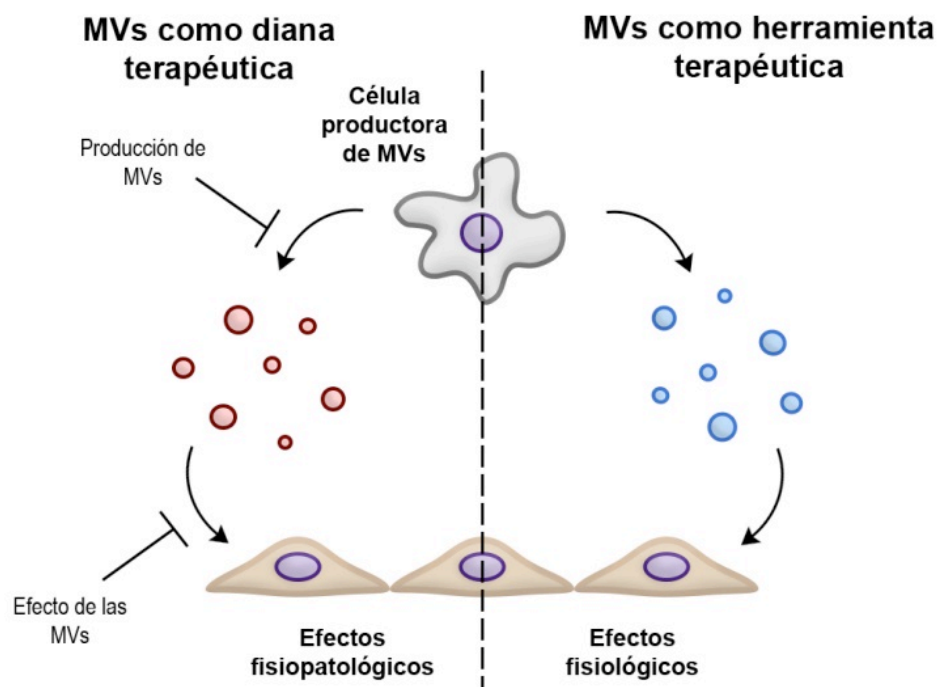


Figura 3. Función de las MVs como diana terapéutica y herramienta terapéutica (8). En el caso de actuar como diana terapéutica, la producción de MVs por diferentes tipos celulares en procesos patológicos, puede ser regulada al inhibir tanto la producción como el efecto de estas MVs. También las MVs pueden actuar como herramienta terapéutica, al poder modificar su contenido y así al actuar sobre la célula diana modifica su respuesta (efectos fisiológicos).

6.1. Microvesículas como diana terapéutica

Las MVs generadas a partir de diferentes tipos de células inducen disfunción endotelial debido a que son responsables de aumentar el estrés oxidativo, reducir la biodisponibilidad de óxido nítrico y producir inflamación cardiovascular. En teoría, el conocimiento sobre su formación y liberación representan un interesante objetivo terapéutico con el fin de limitar los niveles de MVs, pero los mecanismos subyacentes a la liberación no están completamente elucidados y es probable que no sean específicos. En cambio, una inhibición directa o indirecta del efecto que producen las MVs es una propuesta más efectiva (8).

Se ha demostrado el efecto de ciertos fármacos que se utilizan para disminuir el riesgo cardiovascular, tienen sobre los niveles plasmáticos de MVs, lo que sugiere que los efectos beneficiosos de estos fármacos podrían, al menos en parte, estar mediados a través de una reducción de la concentración de MVs (14). Entre estos fármacos y factores se encuentran:

Fármacos anti-ateroscleróticos: ciertos medicamentos cardio-protectores tales como bloqueadores de receptores de angiotensina II y bloqueadores de calcio actúan reduciendo las concentraciones plasmáticas de MVs o sobre marcadores en su superficie (21), lo que sugiere una relación con la acción beneficiosa de estos fármacos sobre

la enfermedad (9).

Hipolipemiantes como las **estatinas**, que disminuyen las concentraciones de colesterol plasmático (especialmente colesterol LDL), a través de la inhibición de la HMGCoA reductasa. Estos fármacos tienen efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades cardiovasculares, no solo por la reducción de los niveles de colesterol, sino también por sus resultados sobre la función endotelial, la inflamación vascular y la activación y agregación de plaquetas (3, 9). Diferentes estudios demuestran que las estatinas reducen el número total de MVs en sangre, incluyendo las MVEs, las MVPs y las MVs derivadas de leucocitos, o modifican su composición (14). Parece ser que las estatinas inhiben la vía de las Rho-quinasas, implicada en la reorganización del citoesqueleto y, por tanto, en la formación de las MVs. Como resultado las estatinas influyen sobre el proceso de secreción de las MVs lo que conlleva una disminución de los niveles de MVs en sangre (3). Entre los estudios mencionados, se ha demostrado que las MVs liberadas por células endoteliales activadas por factor TNF- α , en pacientes con enfermedad coronaria, son suprimidas por fluvastatina (3). Por otro lado, el tratamiento con pravastatina durante 8 semanas redujo la expresión del receptor de GP IIb/IIIa en VEs de plaquetas, en pacientes con DM Tipo 2. Este receptor para el fibrinógeno juega un papel importante en la formación de trombos y está presente en las MVPs, donde su concentración depende del estímulo que ha inducido la formación de éstas. Su inhibición podría disminuir la formación de coágulos y contribuir a la disminución de eventos cardiovasculares. De igual modo, la atorvastatina durante 2 meses de tratamiento en pacientes con DM Tipo 1 y dislipidemia redujo el número de MVs que expresan GP IIb/IIIa, selectina P y FT (14).

Por otro lado, muchos estudios han revelado el efecto de la terapia combinada estatinas junto a fármacos cardio-protectores sobre los niveles plasmáticos de MVs; la asociación de simvastatina con losartán, un antagonista del receptor de angiotensina II utilizado en el tratamiento de la hipertensión, disminuyó las concentraciones de MVEs, MVPs y MVMs en pacientes con hipertensión y DM Tipo 2 (14).

Antiagregantes plaquetarios

a) **Aspirina**: el tratamiento crónico con aspirina (ácido acetilsalicílico) en una dosis estándar de 100 mg una vez al día, se ha comprobado que disminuye los niveles de VEs de plaquetas y VEs endoteliales después de 8 semanas de terapia en un 62,7% y 28,4%, respectivamente (3, 9). Sin embargo, existe una heterogeneidad de resultados dependiendo de la duración del tratamiento (9).

b) **Clopidrogel**: se ha visto que disminuye los niveles de MVEs *in vitro* e *in vivo*. Además, a medida que aumenta la concentración de clopidrogel en sangre disminuye el número de MVPs, lo que sugiere un papel protector frente a la enfermedad coronaria (3).

Antagonistas del receptor de glicoproteína IIb/IIIa: El efecto de estos fármacos está relacionado con

la inhibición de la unión del fibrinógeno a la GP IIb/IIIa, presente en la superficie de la membrana de las MVPs, y consecuentemente, la agregación plaquetaria. El tratamiento con **Abciximab** demostró disminuir los niveles plasmáticos de MVPs con acción pro-coagulante y de MVs derivadas de leucocitos en pacientes con infarto de miocardio (3).

IECAs como el **Irbesartán**: aumentan la movilización de EPCs en aterosclerosis inhibiendo así las MVs circulantes lo que contribuye a la reparación vascular (3).

Antioxidantes: se sabe que el estrés oxidativo, a través del estímulo en la liberación de MVs a plasma, es responsable de numerosos procesos deletéreos en la aterosclerosis. Una posible reducción de los niveles de MVs por el uso de antioxidantes, podría suponer una mejora de la función endotelial y una reducción de la activación plaquetaria (14). Curiosamente, un estudio que analiza los efectos del tratamiento con vitamina C durante 5 días, ha informado de una disminución de MVEs y MVPs en pacientes diabéticos y con dislipidemia después de sufrir infarto de miocardio, lo que contribuye a mejorar la función endotelial (3).

Dieta: Diferentes autores han resaltado la importancia de la dieta sobre la liberación de MVs, siendo quizás estas uno de los mecanismos implicados en el papel que la dieta tiene sobre el desarrollo de patologías cardiovasculares (35, 36).

a) Alimentos ricos en ácidos grasos monoinsaturados disminuyen los niveles de MVEs y aumentan la concentración de células endoteliales progenitoras en sangre, lo que refleja su acción a la hora de reducir el daño endotelial.

b) Polifenoles solos o junto con espirolactona previenen el aumento de la concentración de MVs en sangre, la inflamación vascular, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial.

c) Flavonoides mejoran la función endotelial pues disminuyen los niveles de MVEs (3).

Otra vía de control terapéutico puede estar en el área de prevención de la interacción de las MVEs con el tejido diana. Este tipo de mecanismo terapéutico podría explorarse para prevenir interacciones con un tipo de interés celular. Los antagonistas de la integrina β_3 se han utilizado para evitar que las MVs interactuaran con el endotelio en un modelo de vaso-reactividad de la aorta del ratón. Los agentes específicos que se dirigen a la generación de MVEs también podrían ser de valor, tales como agentes que inhiben la actividad de la calpaína, la quinasas Rho o la disrupción del citoesqueleto (14).

6.2. Microvesículas como herramienta terapéutica

Las MVs pueden provocar efectos funcionales sobre células diana a través de diversos mecanismos conocidos como el contacto directo vesícula-célula, por interacción ligando-receptor, fusión y transferencia del contenido vesicular a la célula diana o indirectamente proporcionando un sitio de acoplamiento de moléculas o células que

interaccionan con la célula diana (13).

Los elevados niveles plasmáticos de MVs no siempre se acompañan por un efecto deletéreo; de hecho, algunas poblaciones de MVs pueden entregar mensajes biológicos protectores, preservando la función endotelial y/o la integridad vascular. Por ejemplo, las MVs circulantes de pacientes con sepsis han demostrado tener función protectora, en lugar de perjudicial, porque restauran la hiporeactividad vascular en vasos tratados con lipopolisacáridos a través de una mejora de la producción de tromboxano A2 (8).

Hay fenotipos específicos de MVs que tienen potencial terapéutico por su papel en la modulación de procesos y mecanismos celulares y por la capacidad de inducir reparación tisular después de la reprogramación de la célula diana; algunas MVs actúan sobre las EPCs aumentando su capacidad de diferenciarse a células endoteliales maduras y de migrar a las zonas lesionadas para reparar la lesión vascular (8).

Estas propiedades vienen de la gran variedad de biomoléculas y sustancias bioactivas con función anticoagulante y antiinflamatoria que contienen (37). Pérez Casal *et al.*, demostraron que se produce una liberación de MVs por células endoteliales tras exponerse a proteína C activada (APC); esta proteína C es un mediador con actividad anticoagulante y antiinflamatoria que reduce la producción de 1) trombina al inhibir la acción de los factores Va y VIII, 2) FT y 3) citoquinas, IL-6 y TNF- α , a través de su unión al receptor de proteína C en las células endoteliales y en las MVEs (21).

Desde que se conoce que las MVs son capaces de transferir a otras células información biológica, cobra mayor interés el uso de éstas como vehículo de suministro de moléculas con potencial terapéutico (21); su contenido podría modificarse químicamente para obtener una entrega más específica de moléculas bioactivas a un cierto tipo de célula que deba ser reparada o eliminada (37). También, por su capacidad para superar barreras naturales, sus propiedades en la comunicación celular y su estabilidad en la circulación, las MVs pueden aportar múltiples ventajas en terapias dirigidas como sistema de administración de terapias farmacológicas actualmente disponibles. Sin embargo, esta aplicación farmacéutica de las MVs tiene limitaciones por la falta de métodos y experiencia para el aislamiento de éstas y problemas asociados a la inyección de cantidad de fármaco suficiente para ser efectivo (21).

7. CONCLUSIÓN

Los diferentes tipos de MVs juegan un papel crucial en muchos procesos fisiológicos y patológicos. La medida de la disfunción endotelial a través de la detección de niveles plasmáticos de MVs mediante métodos mínimamente invasivos constituye una interesante perspectiva de ayuda diagnóstica y de orientación pronóstica adicional a la que se obtiene con la evaluación tradicional de los factores de riesgo convencionales.

Dado que se ha demostrado que las MVs actúan como mecanismos etiopatogénico en la disfunción endotelial y

subsecuente, en la enfermedad cardiovascular, caracterizar la expresión diferencial que caracteriza a estas MVs está permitiendo identificar nuevas dianas terapéuticas en estas patologías que incluso, emplean las MVs como herramienta farmacológica.

CONFLICTO DE INTERÉS Y DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los autores declaran no tener conflictos de intereses. Los nombres y direcciones de correo-e se usarán exclusivamente para los fines indicados y no estarán disponibles para ningún otro propósito o persona

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el Plan Nacional Proyectos de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Fondos Feder (PI14/00806); Red de Investigación Renal (REDinREN; RD16/0009/0034) and Junta de Andalucía Grants, P12-CTS-7352.

8. REFERENCIAS

1. Emanuelli C, Shearn AI, Angelini GD, Sahoo S. Exosomes and exosomal miRNAs in cardiovascular protection and repair. *Vascul Pharmacol.* 2015;71:24-30.
2. Milasan A, Tessandier N, Tan S, Brisson A, Boilard E, Martel C. Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:31427.
3. Yin M, Loyer X, Boulanger CM. Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015;763(Pt A):90-103.
4. Rovira J, Diekmann F, Campistol JM, Ramírez-Bajo MJ. Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury. *Nefrologia.* 2017;37(2):126-37.
5. Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem.* 2013;59(8):1166-74.
6. Díez-Campos A. Fisiopatología de la aterosclerosis. *Acta Neurol Colomb* 2010; 26(2): 4-15.
7. Mahajan K. Microparticles in Atherosclerosis: Biomarkers of Disease. *J Clin Exp Cardiology* 2015; 6:356.
8. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(11):659-65.
9. Tomaniak M, Gąsecka A, Filipiak KJ. Cell-derived microvesicles in cardiovascular diseases and antiplatelet therapy monitoring - A lesson for future trials? Current evidence, recent progresses and perspectives of clinical application. *Int J Cardiol.* 2017;226:93-102.
10. Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, et al. Association of circulating endothelial microparticles with

- cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J*. 2014;35(42):2972-9.
11. Xiong J, Miller VM, Li Y, Jayachandran M. Microvesicles at the crossroads between infection and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59(2):124-32.
 12. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods*. 2012;375(1-2):207-14.
 13. Curtis AM, Edelberg J, Jonas R, Rogers WT, Moore JS, Syed W, et al. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med*. 2013;18(4):204-14.
 14. Baron M, Boulanger CM, Staels B, Tailleux A. Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med*. 2012;16(7):1365-76.
 15. Minciocchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:41-51.
 16. Espinosa Ferrer S. Tesis doctoral "Neovascularización mediada por factor tisular en la placa aterosclerótica"; Universidad de Barcelona, 2015.
 17. França CN, Izar MC, Amaral JB, Tegani DM, Fonseca FA. Microparticles as potential biomarkers of cardiovascular disease. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(2):169-74.
 18. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(5):H1910-5.
 19. Bodega G, Alique M, Bohórquez L, Ciordia S, Mena MC, Ramírez MR. The Antioxidant Machinery of Young and Senescent Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Their Microvesicles. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:7094781.
 20. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(2):273-83.
 21. Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;106(Pt A):148-56.
 22. Paudel KR, Panth N, Kim DW. Circulating Endothelial Microparticles: A Key Hallmark of Atherosclerosis Progression. *Scientifica (Cairo)*. 2016;2016:8514056.
 23. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(7):423-41.
 24. Qian Z, Shen Q, Yang X, Qiu Y, Zhang W. The Role of Extracellular Vesicles: An Epigenetic View of the Cancer Microenvironment. *Biomed Res Int*. 2015;2015:649161.
 25. Lei Q, Liu T, Gao F, Xie H, Sun L, Zhao A, et al. Microvesicles as Potential Biomarkers for the Identification of Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells. *Theranostics*. 2017;7(10):2673-89.
 26. Soriano S, Carmona A, Triviño F, Rodriguez M, Alvarez-Benito M, Martín-Malo A, et al. Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(11):F1302-11.
 27. Liu ML, Williams KJ. Microvesicles: potential markers and mediators of endothelial dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012;19(2):121-7.
 28. Schiro A, Wilkinson FL, Weston R, Smyth JV, Serracino-Inglott F, Alexander MY. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*. 2014;234(2):295-302.
 29. Luna C, Carmona A, Alique M, Carracedo J, Ramirez R. TNF α -Damaged-HUVECs Microparticles Modify Endothelial Progenitor Cell Functional Activity. *Front Physiol*. 2015;6:395.
 30. Buendía P, Montes de Oca A, Madueño JA, Merino A, Martín-Malo A, Aljama P, et al. Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification. *FASEB J*. 2015;29(1):173-81.
 31. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res*. 2011;109(1):e1-12.
 32. Alique M, Ruíz-Torres MP, Bodega G, Noci MV, Troyano N, Bohórquez L, et al. Microvesicles from the plasma of elderly subjects and from senescent endothelial cells promote vascular calcification. *Aging (Albany NY)*. 2017.
 33. Carmona A, Agüera ML, Luna-Ruiz C, Buendía P, Calleros L, García-Jerez A, et al. Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(4):F673-F81.
 34. Valencia-Nuñez DM, Kreutler W, Moya-Gonzalez J, Alados-Arboledas P, Muñoz-Carvajal I, Carmona A, et al. Endothelial vascular markers in coronary surgery. *Heart Vessels*. 2017.
 35. Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Carracedo J, et al. Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(2):267-74.
 36. Marin C, Delgado-Lista J, Ramirez R, Carracedo J, Caballero J, Perez-Martinez P, et al. Mediterranean diet reduces senescence-associated stress in endothelial cells. *Age (Dordr)*. 2012;34(6):1309-16.
 37. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Extracellular vesicles and atherosclerotic disease. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(14):2697-708.



The nucleotide vesicular transporter (VNUT). Relevance in neural and neuroendocrine tissues. New pharmacological perspectives

Title in Spanish: *El transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). Relevancia en tejidos neurales y neuroendocrinos. Nuevas perspectivas farmacológicas*

Aida Menéndez Méndez¹, Juan Ignacio Díaz Hernández¹, Felipe Ortega¹, Rosa Gómez Villafuertes¹, Javier Gualix^{1,*}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria. Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica (IUN). Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC). Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

ABSTRACT: Vesicular storage of neurotransmitters, which allows their subsequent exocytotic release, is essential for chemical transmission in neurons and endocrine cells. Neurotransmitter uptake to secretory vesicles is carried out by vesicular transporters, which use the electrochemical gradient of protons generated by a vacuolar proton-ATPase as transport driving force. ATP and other nucleotides and dinucleotides are relevant signaling molecules that participate in a variety of biological process. Although the active transport of nucleotides has been pharmacologically and biochemically characterized in a diversity of secretory vesicles, the protein responsible for such vesicular accumulation remained unidentified for some time. In 2008, *SLC17A9*, the last identified member of the SLC17 transporter family, was found to encode the vesicular nucleotide transporter (VNUT). VNUT is expressed in various ATP-secreting cells and is able to transport several nucleotides in a vesicular membrane potential- dependent fashion. *VNUT* knockout mice lack vesicular storage and release of ATP from neurons and neuroendocrine cells, resulting in blockage of the purinergic chemical transmission. This review summarizes the current studies on VNUT and analyzes the relevance of vesicular nucleotide transport in different cells types and tissues. The possible use of VNUT inhibitors and interference RNA to reduce *VNUT* gene expression for therapeutic purposes is also discussed.

RESUMEN: El almacenamiento vesicular de los neurotransmisores, que permite su subsecuente liberación exocitótica, es un proceso esencial para la transmisión química en neuronas y células endocrinas. La acumulación de los neurotransmisores en vesículas de secreción se lleva a cabo por medio de transportadores vesiculares, que utilizan el gradiente electroquímico de protones generado por una ATPasa vacuolar como fuerza impulsora del transporte. El ATP, así como otros nucleótidos y dinucleótidos, son importantes moléculas señalizadoras que intervienen en una gran variedad de procesos biológicos. Aunque el transporte activo de nucleótidos se ha caracterizado desde el punto de vista bioquímico y farmacológico en una variedad de vesículas de secreción, la proteína responsable de esta acumulación vesicular permaneció durante mucho tiempo desconocida. En 2008, se demostró que *SLC17A9*, el último miembro identificado de la familia de transportadores SLC17, codifica el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). VNUT se expresa en una variedad de células que liberan ATP y ha mostrado ser capaz de transportar varios nucleótidos de manera dependiente del potencial de membrana vesicular. Ratones deficientes en VNUT pierden la capacidad de almacenar y liberar ATP de neuronas y células neuroendocrinas, lo que resulta en un bloqueo de la transmisión química purinérgica. En esta revisión se pretende resumir los estudios llevados a cabo hasta la fecha sobre VNUT y analizar la relevancia del transporte vesicular de nucleótidos en distintos tipos celulares y tejidos. Asimismo, se discute el posible uso de inhibidores de VNUT, así como de ARNs de interferencia que reduzcan su expresión, con fines terapéuticos.

*Corresponding Author: jgualix@ucm.es

Received: February 28, 2018 Accepted: March 5, 2018

Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, N° 1 (2018), pp. 16-38

Language of Manuscript: Spanish

1. TRANSPORTADORES VESICULARES DE NEUROTRANSMISORES, VNTS

La transmisión química en la sinapsis juega un papel central en la comunicación celular en el sistema nervioso central y periférico. Este proceso requiere del almacenamiento previo de los neurotransmisores en vesículas sinápticas y su posterior liberación mediante un proceso de exocitosis dependiente de Ca^{2+} . Los neurotransmisores liberados se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de las células diana, transmitiendo de este modo una señal. Ejemplos de moléculas que median este tipo de transmisión lo constituyen el glutamato, el aspartato, el ATP y otros nucleótidos, el ácido γ -aminobutírico (GABA), la glicina, la acetilcolina o las monoaminas (catecolaminas, serotonina e histamina). Los transportadores vesiculares de neurotransmisores (VNTs, del inglés *Vesicular Neurotransmitter Transporters*) son las proteínas responsables del almacenamiento de estos compuestos en las vesículas sinápticas, determinando así la cantidad de neurotransmisor disponible para ser liberado por exocitosis, y son, por tanto, componentes esenciales de la transmisión química en el sistema nervioso (1-3) (Figura

1).

Alteraciones en la actividad de estas proteínas pueden contribuir a la etiología de determinadas enfermedades neurodegenerativas. Este es el caso del transportador vesicular de monoaminas, que secuestrando la dopamina en el interior de vesículas de secreción, prevendría el efecto neurotóxico de esta sustancia en el citosol. La disfunción de esta proteína conduciría a la acumulación de un exceso de dopamina citoplasmática, que es metabolizada generando especies reactivas de oxígeno, las cuales causan un daño oxidativo que puede conducir finalmente a la muerte de la neurona dopaminérgica (4). Se ha sugerido que la pérdida de función de este transportador está relacionada con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (5, 6), que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriales.

Además de su papel en las células neurales, los VNTs están presentes también en la membrana de vesículas de secreción en diversas células neuroendocrinas, como las células cromafines de la médula adrenal (7, 8), así como en otra gran variedad de células secretoras (9-12).

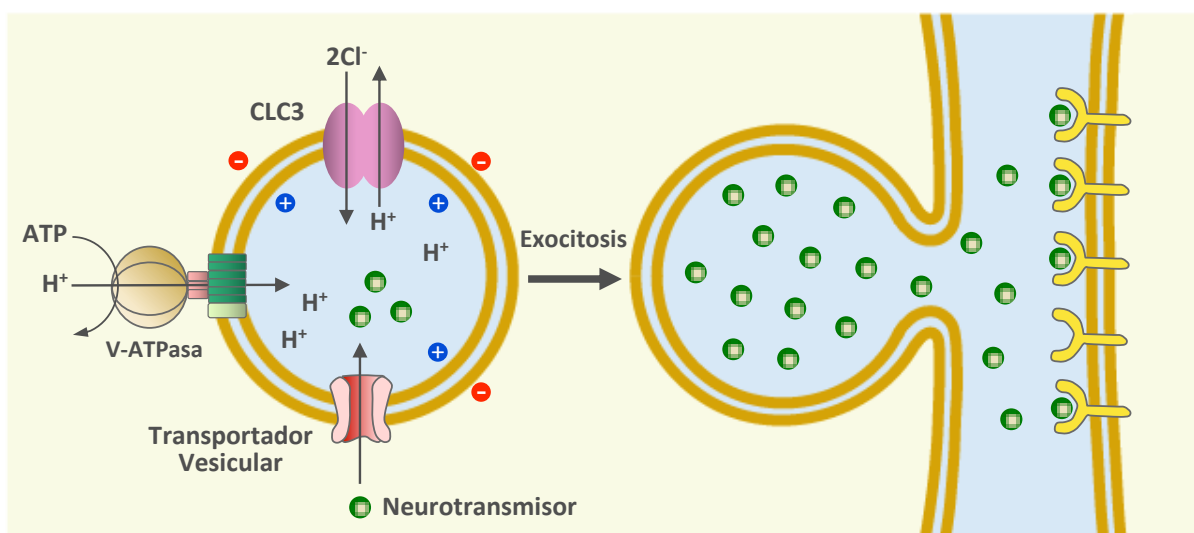


Figura 1. Papel de los transportadores vesiculares de neurotransmisores (VNTs) en la sinapsis. Los VNTs son sistemas de transporte activo que llevan a cabo el almacenamiento de los neurotransmisores en las vesículas sinápticas, para su posterior liberación exocitótica en la sinapsis. Adaptado y modificado de (3).

1.1. Clasificación y características generales de los VNTs

Hasta la fecha, se han identificado diez VNTs que se han clasificado en tres subclases en función de la similitud de sus secuencias aminoácidas y la especificidad de sustrato: las familias SLC17, SLC18 y SLC32, responsables de la acumulación de transmisores aniónicos, catiónicos y neutros, respectivamente (Figura 2). La familia SLC17 incluye las tres isoformas del transportador vesicular de glutamato (VGLUT, del inglés *Vesicular Glutamate Transporter*), el transportador vesicular de aminoácidos excitatorios/sialina (VEAT, del inglés *Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter*) y el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT, del inglés

Vesicular Nucleotide Transporter) (13). Además de estos transportadores vesiculares de neurotransmisores, cuatro transportadores de fosfato dependientes de Na^+ (NPT1, NPT3, NPT4 y homólogo NPT) se incluyen también dentro de esta familia (Figura 2). Estas proteínas NPT están implicadas en la eliminación de aniones orgánicos tóxicos en el hígado y el riñón y no están relacionadas con la transmisión de señal. La familia SLC18 se compone del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT, del inglés *Vesicular Acetylcholine Transporter*), las dos isoformas del transportador vesicular de monoaminas (VMAT, del inglés *Vesicular Monoamine Transporter*) y el transportador vesicular de poliaminas (VPAT, del inglés

Vesicular Polyamine Transporter) (14, 15). Finalmente, el transportador vesicular de GABA/glicina (VGAT, del inglés *Vesicular GABA Transporter*), también denominado transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios

(VIAAT, del inglés *Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter*), es el único miembro de la familia SLC32 (16).

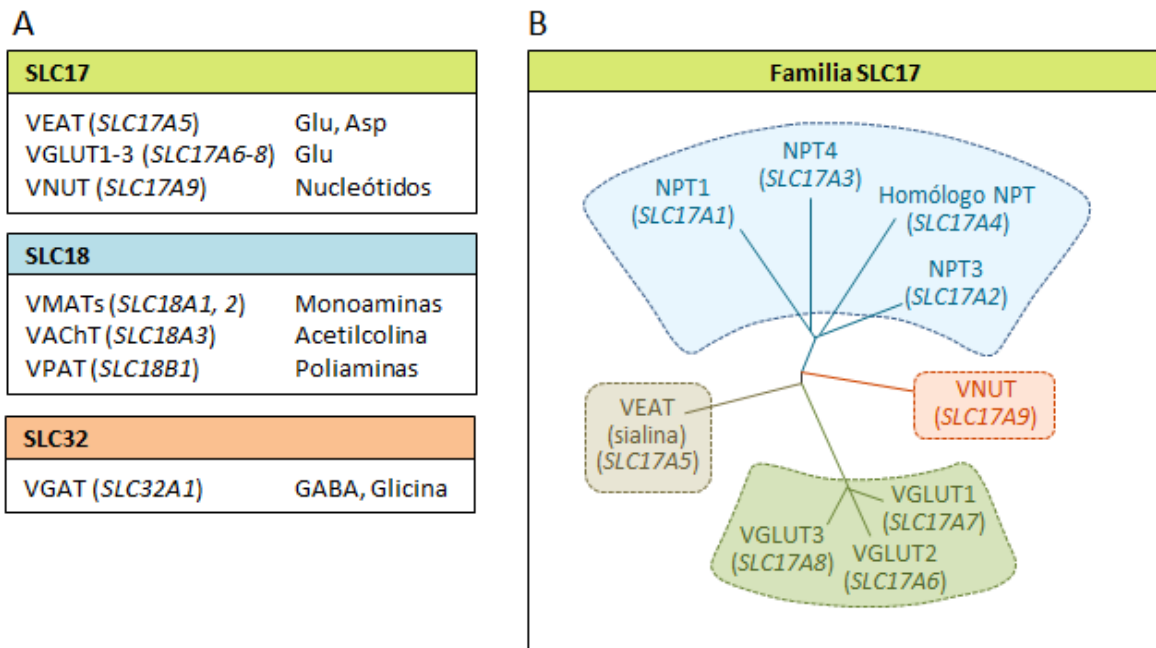


Figura 2. Clasificación de los VNTs. **(A)** En la figura se muestran las tres familias en las que se clasifican los transportadores vesiculares de neurotransmisores. El nombre de la proteína, del correspondiente gen (entre paréntesis), así como el sustrato del transporte, aparecen indicados en cada caso. **(B)** Árbol filogenético de la familia de transportadores SLC17. Adaptado y modificado de (2).

Los transportadores vesiculares son sistemas de transporte activo secundario que emplean el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) generado por una H^+ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa) para impulsar el transporte de neurotransmisores en contra de un gradiente de concentración (17, 18). Esta V-ATPasa es una bomba de protones estructuralmente y funcionalmente relacionada con la F_0F_1 -ATPasa mitocondrial, pero es incapaz de sintetizar ATP. En su lugar, la V-ATPasa usa la energía producida por la hidrólisis de ATP citosólico para introducir protones en el interior de las vesículas (19, 20). El flujo de protones hace que el interior de la vesícula sea más ácido, estableciendo un gradiente de pH (ΔpH) a través de la membrana vesicular. Al mismo tiempo, el interior de la vesícula se hace más positivo, estableciéndose el correspondiente potencial de membrana ($\Delta\psi$). La suma de estos dos efectos constituye el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$). El gradiente de protones (ΔpH) y el potencial de membrana ($\Delta\psi$) típico de las vesículas sinápticas es de 1,5 y 80 mV respectivamente, lo que proporciona la energía suficiente para el almacenamiento vesicular de los neurotransmisores (17, 18). La necesidad de una V-ATPasa para el transporte vesicular ha sido puesta de manifiesto mediante el uso de la bafilomicina A1, un inhibidor específico de esta proteína que impide la generación del gradiente electroquímico y, por tanto, el transporte de los

neurotransmisores (7, 21). No obstante, cada transportador vesicular depende mayoritariamente de uno de los componentes del $\Delta\mu_{H^+}$, bien ΔpH , referido a la concentración de protones, o bien $\Delta\psi$, dado por la carga iónica neta (22). Esto ha sido demostrado mediante el uso de ionóforos, como la valinomicina o la nigericina, que disipan selectivamente uno de los componentes del gradiente electroquímico de protones. Más recientemente, la reconstitución de los transportadores en vesículas artificiales, como liposomas, permite controlar separadamente las condiciones iónicas del medio luminal y externo para llevar a cabo estos estudios de la dependencia del transporte (3, 23, 24). Mientras que los transportadores VMAT y VAcHT utilizan principalmente el componente químico del gradiente, ΔpH (21), VGLUT depende casi exclusivamente del componente eléctrico, $\Delta\psi$ (25). De igual forma, tanto el VEAT como el VNUT utilizan la $\Delta\psi$ para llevar a cabo su actividad (26, 27). En el caso de VGAT, un reciente estudio con el transportador reconstituido en membranas artificiales sugiere que podría operar como un cotransportador de Cl^- , impulsado por $\Delta\psi$ sin la necesidad de ΔpH (24). Sin embargo, la mayoría de trabajos coinciden en señalar que el transporte es igualmente dependiente tanto de $\Delta\psi$ como de ΔpH (16, 28), lo que se cree que es el resultado de un concomitante intercambio de H^+ por el aminoácido neurotransmisor (29, 30) (Figura 3).

Otra de las diferencias que existen entre los distintos VNTs, es el tipo de transporte que realizan (Figura 3). Los miembros de la familia SLC17 que transportan neurotransmisores aniónicos, llevan a cabo un sistema de transporte de tipo uniporte (31). Sin embargo, en el caso de los VGLUTs, aunque se ha demostrado que $\Delta\psi$ es la fuerza impulsora primaria del transporte, existe cierta controversia sobre la contribución, si la hay, de ΔpH . Varios trabajos han mostrado una contribución significativa de este componente en el transporte de glutamato a vesículas (32-35), lo que plantea la posibilidad de que VGLUT opere como un antiportador glutamato/ H^+ . Por su parte, tanto el VMAT como el VACHT, así como el recientemente clonado VPAT, emplean un mecanismo de transporte de tipo antiporte, en el que intercambian los protones del lumen vesicular por el neurotransmisor

catiónico presente en el citosol. La estequiometría de los dos primeros transportadores es de dos protones por cada molécula de neurotransmisor almacenada (36, 37) lo que explica la mayor dependencia de ΔpH que de $\Delta\psi$ en este tipo de transporte. En el caso de VGAT, responsable del almacenamiento vesicular de neurotransmisores eléctricamente neutros, como se ha mencionado anteriormente, su mecanismo de transporte ha sido objeto de controversia, habiéndose propuesto tanto un cotransporte de GABA o glicina con Cl^- , mediante el que se introducirían en el interior de la vesícula dos Cl^- por molécula de neurotransmisor en cada ciclo de transporte (24), como, en estudios más recientes, un mecanismo de antiporte que conduciría al intercambio de protones lumbales por el aminoácido neurotransmisor (29, 30).

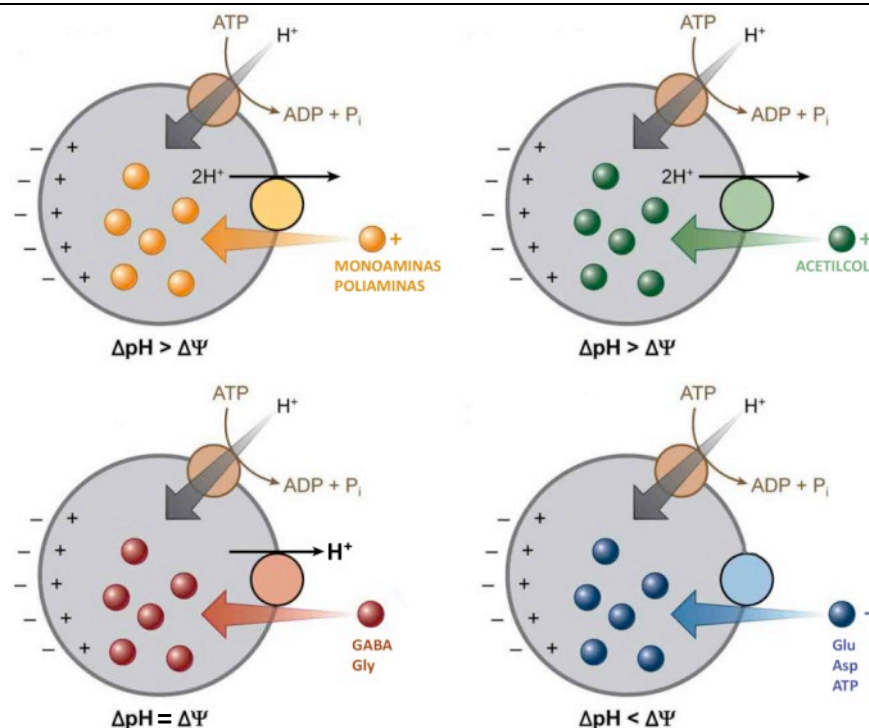


Figura 3. Los VNTs muestran distinta dependencia de los dos componentes del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$). La V-ATPasa establece un $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ a través de la membrana vesicular que es utilizado como fuerza motriz por los VNTs. Los distintos VNTs utilizan mayoritariamente uno de los componentes de $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ (ΔpH o $\Delta\psi$). El transporte de aminos y acetilcolina, sustratos con carga positiva, depende de ΔpH en mayor medida que de $\Delta\psi$. GABA y glicina son transportados como zwitteriones eléctricamente neutros y su transporte depende igualmente del componente químico (ΔpH) y eléctrico ($\Delta\psi$) de $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. El transporte de neurotransmisores aniónicos, como el glutamato, el aspartato o los nucleótidos, es impulsado principalmente por el componente eléctrico ($\Delta\psi$) del gradiente electroquímico de protones. Adaptado y modificado de (22).

Otros factores pueden afectar a la cantidad de neurotransmisor que se almacena en la vesícula, como la afinidad de sustrato, el volumen vesicular o las proteínas intraluminales. Así mismo, la presencia del ion Cl^- es necesaria para ciertos transportadores como los VGLUT. El transporte de glutamato a las vesículas muestra una dependencia bifásica con la concentración de este ion: bajas concentraciones de Cl^- (2-8 mM) estimulan el

transporte mientras que altas concentraciones (>20 mM) lo inhiben. Se ha sugerido que el Cl^- actúa como un activador alostérico de VGLUT que desencadena la captación de glutamato tras su unión al transportador (38), mientras que la inhibición por altas concentraciones de Cl^- podría estar relacionada con la disipación de $\Delta\psi$, el componente de $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ que impulsa el transporte de glutamato. Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente a la regulación de

VGLUT por Cl⁻ está aún por aclararse. Esta fuerte dependencia de la actividad de transporte con la concentración de Cl⁻ es una característica compartida por otros miembros de la familia SLC17 como el VNUT (27).

En cuanto a la afinidad por el sustrato, también existen diferencias entre los distintos transportadores. Los VMATs son los que presentan mayor afinidad aparente de sustrato, con unos valores de K_m en el rango submicromolar o micromolar bajo, lo que presumiblemente permitiría a estos transportadores alcanzar la máxima actividad a bajas concentraciones citosólicas del neurotransmisor. El VACHT, aunque presenta una secuencia primaria similar al VMAT (39), muestra un valor de K_m mucho mayor (~0,4 mM) (21). En el caso de VGAT, éste reconoce tanto el GABA como la glicina, ambos neurotransmisores inhibitorios (40). Con la menor afinidad aparente de todos los transportadores vesiculares (K_m ~5 mM para GABA, K_m ~25 mM para glicina), probablemente requiera una elevada concentración citosólica del neurotransmisor, producida por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, del inglés *glutamic acid decarboxylase*), en el caso del GABA, o por el transportador de membrana de glicina, GLYT2, en el caso de este aminoácido. Por su parte, los VGLUTs (VGLUT1-3) también presentan un valor de K_m en el rango milimolar bajo, siendo la isoforma VGLUT3 la que muestra una ligera mayor afinidad aparente (K_m ~0,5 mM) (41).

A pesar de su importante papel en el relleno de las vesículas y la liberación de neurotransmisores, poco es lo que se conoce acerca de la regulación de la actividad de estos transportadores vesiculares. Esta regulación puede llevarse a cabo a nivel de la fuerza impulsora del transporte, mediante cambios en la magnitud de $\Delta\mu_{H^+}$, ΔpH o $\Delta\psi$. Además, alteraciones en el tráfico intracelular de estos transportadores de neurotransmisores tiene el potencial de influir en su número en las vesículas sinápticas. Curiosamente, psicoestimulantes como la cocaína o la metanfetamina han mostrado ser capaces de afectar a la localización y función de VMAT2 (42, 43). También, diversos trabajos han descrito la regulación del transporte de neurotransmisores a vesículas por proteínas G heterotriméricas, en particular la subunidad $G\alpha_2$ (44-46). Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo molecular de esta modulación, podría implicar la interacción directa de la proteína G con el transportador vesicular (44, 47).

2. EL TRANSPORTADOR VESICULAR DE NUCLEÓTIDOS, VNUT

El ATP es una molécula ampliamente conocida por su importante papel como “moneda energética” generada por la glicolisis, la respiración celular y otras reacciones, siendo utilizada para proporcionar energía en una multitud de procesos bioquímicos. Sin embargo, en las últimas décadas se ha hecho evidente que el ATP y otros nucleótidos actúan también como importantes moléculas señalizadoras que intervienen en una gran variedad de procesos biológicos a través de su interacción con

receptores de membrana, denominados receptores purinérgicos, de los cuales existen dos clases: receptores ionotrópicos P2X y metabotrópicos P2Y (48, 49). La degradación de los nucleótidos por ectonucleotidasas, enzimas localizados en la superficie celular, proporciona el necesario mecanismo para regular las acciones mediadas por receptor de estos compuestos (50). Como resultado de la hidrólisis ectoenzimática de los nucleótidos se genera, como producto final, la adenosina; la cual puede actuar sobre sus propios receptores, antes de ser recaptada por las células a través de sistemas de transporte específicos en la membrana plasmática (51). Por su parte, los diadenosina polifosfato (abreviadamente Ap_nA) constituyen un grupo de sustancias estructuralmente relacionadas con el ATP. Estos compuestos están constituidos por dos nucleósidos de adenina enlazados por un número variable de grupos fosfato. Estos dinucleótidos son sustancias ubicuas, presentes en el interior de las células de los diferentes organismos, desde bacterias a mamíferos, donde se ha sugerido que pueden ser sintetizados por acción de determinadas aminoacil-ARNt sintetetasas y otras enzimas que catalizan la transferencia de residuos adenililo (52-55). Al igual que ocurre con el ATP y otros nucleótidos, los diadenosina polifosfato pueden ser liberados por diversos tipos celulares, actuando como moléculas señalizadoras que inducen una gran variedad de respuestas biológicas (56, 57).

En consonancia con su papel como mensajeros, se ha descrito la acumulación de estas sustancias en diversas vesículas de secreción. El ATP y otros nucleótidos, así como los diadenosina polifosfato, se hallan almacenados junto a catecolaminas en los gránulos de las células cromafines (58-60). Estos compuestos coalmacenados son liberados conjuntamente al medio extracelular mediante un proceso de exocitosis (58, 61). El almacenamiento de ATP en vesículas sinápticas y su liberación de forma exocitótica y dependiente de Ca²⁺ ha sido ampliamente descrita tanto en nervios periféricos como en el sistema nervioso central (62-66). Este nucleótido actúa como un neurotransmisor excitatorio rápido o como un neuromodulador y ejerce potentes efectos a largo plazo en la diferenciación, proliferación y muerte celular, estando implicado en los procesos de desarrollo y regeneración, así como en varias patologías, del sistema nervioso (67, 68). Por su parte, los diadenosina polifosfato se hallan almacenados en vesículas sinápticas de las terminales colinérgicas aisladas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata*, así como en terminales de cerebro medio de rata (69, 70). También se ha descrito la liberación de los diadenosina polifosfato de las terminales de cerebro de rata, inducida por agentes despolarizantes, (70). Asimismo, los gránulos densos de las plaquetas, los gránulos secretores de insulina de las células β pancreáticas y los gránulos que contienen histamina de los mastocitos, son capaces de almacenar también ATP y otros nucleótidos (71-73).

Ya en los primeros estudios de la acumulación del ATP en vesículas de secreción se puso de manifiesto un problema inherente a este tipo de ensayos: el transporte

vesicular de ATP requiere el consumo de ATP por la V-ATPasa para generar el gradiente electroquímico de protones que impulse el transporte activo, pero si esto ocurre, el ATP, como sustrato para el transporte, disminuye, dificultando así la medida cuantitativa de dicho transporte. Rudnick se refirió a este dilema como “el demonio del transporte de ATP” (74). Sin embargo, a pesar de esta dificultad añadida, ha sido posible describir adecuadamente las características de este sistema de transporte.

2.1. Transporte de nucleótidos a gránulos cromafines

Las primeras evidencias del transporte de nucleótidos a gránulos cromafines fueron obtenidas en la década de 1970. Varios trabajos mostraron que es posible marcar el ATP presente en el interior de los gránulos perfundiendo las glándulas adrenales con [³H]-adenosina o [³²P]-fosfato (75-77). Más adelante, se demostró que dicho ATP no era generado en el interior de los gránulos, sino que era sintetizado en el exterior y posteriormente transportado al interior de estos orgánulos (78).

Para tratar de caracterizar el transporte de ATP, se llevaron a cabo una serie de experimentos en gránulos aislados. La existencia de un proceso de transporte dependiente de temperatura y bloqueado por atractilósido, un compuesto previamente descrito como inhibidor del intercambiador ADP/ATP de la mitocondria, llevó a pensar que se trataba de un mecanismo mediado por transportador en lugar de un mero proceso de difusión pasiva (79). El hecho de que el transporte de nucleótidos sea activado por Mg²⁺ e inhibido por EDTA (80), hizo pensar que el transporte de nucleótidos estaba ligado a la ATPasa dependiente de Mg²⁺ presente en la membrana de los gránulos, la cual actúa como una bomba de protones, originando un gradiente electroquímico necesario para el transporte. Empleando iones NH₄⁺, los cuales eliminan el gradiente de pH, o nigericina, que en presencia de K⁺ extragranular también suprime el gradiente de pH mediante el intercambio de K⁺ por H⁺, el transporte de nucleótidos continuaba activado (80). Por otro lado, empleando iones permeables, como tiocianato, los cuales neutralizan la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, el transporte de nucleótidos quedaba fuertemente inhibido (81). Todo ello indicaba que este transporte depende de la parte eléctrica del gradiente ($\Delta\psi$).

El análisis cinético del transporte de ATP a los gránulos arroja un valor de K_m para el ATP en torno a 1 mM, en ausencia de Mg²⁺ (80, 81). Sin embargo, la K_m para el ATP en presencia de Mg²⁺ parece ser de 2,9 mM (81). El transportador no es específico, sino que es capaz de transportar otros nucleótidos de adenina como ADP y AMP, así como GTP y UTP (80, 81) (Figura 4). Cuando los gránulos fueron incubados con ADP marcado, aparecía dentro del gránulo, no sólo este compuesto, sino además cantidades significativas de ATP marcado (80). Este ATP no era generado en el medio de incubación y posteriormente captado por los gránulos, sino que el ADP era transformado en ATP tras su transporte al interior de los orgánulos, probablemente mediante una reacción de

transfosforilación con los nucleótidos ya presentes en el interior de las vesículas. Más adelante se demostró que las proteínas solubles de los gránulos cromafines contienen una enzima capaz de transferir el grupo fosfato terminal del ATP al ADP (82, 83).

Una nueva aproximación metodológica al estudio del transporte de nucleótidos a los gránulos cromafines, se llevó a cabo mediante el uso de derivados fluorescentes de los nucleótidos de adenina como sustratos del transporte y el análisis y medida de los nucleótidos internalizados, por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), tras la lisis de los orgánulos. Estos análogos fluorescentes de los nucleótidos contienen un puente eteno adicional en el anillo de purina y son conocidos como eteno-nucleótidos (ϵ -nucleótidos). Estos estudios permitieron establecer la incorporación de los derivados fluorescentes del ATP, ADP y AMP (ϵ -ATP, ϵ -ADP y ϵ -AMP) al interior de los gránulos cromafines (8), lo que es una prueba adicional de la falta de especificidad del transportador (Figura 4). Esta metodología también proporciona una aproximación útil al estudio del metabolismo de los nucleótidos tras su internalización en los gránulos. Estos estudios corroboraron la existencia de actividades enzimáticas que intercambian los grupos fosfato entre los nucleótidos internalizados, indicando que el contenido intragranular de nucleótidos puede no reflejar la distribución de estos compuestos en el citosol. En este sentido, se midieron elevados niveles de ϵ -ATP en el interior de los gránulos tras el transporte de ϵ -ADP (8). Además, se describió la presencia de ϵ -adenosina tetrafosfato (ϵ -Ap₄) en el interior de los orgánulos tras el transporte de ϵ -ATP (84). El adenosina tetrafosfato (Ap₄) es un constituyente natural de los gránulos cromafines (84, 85) que actúa como un potente agonista de determinados receptores purinérgicos (86). Una posible explicación a su presencia en el interior de los orgánulos, además de su transporte desde el exterior de las vesículas, dada la baja especificidad del transportador, podría ser su síntesis intragranular, mediante el intercambio de fosfato entre los nucleótidos granulares, de acuerdo a los resultados obtenidos tras el transporte de ϵ -ATP (84). El uso de estos derivados fluorescentes como sustrato del transporte, ha permitido también el estudio del almacenamiento de los nucleótidos en los gránulos cromafines mediante la técnica de citometría de flujo (87). Estos ensayos mostraron además un inesperado incremento en el tamaño de los gránulos, dependiente de la concentración de ϵ -ATP, que tenía lugar en paralelo con el incremento de fluorescencia debido a la acumulación de este nucleótido en las vesículas (87).

A pesar de la creciente relevancia fisiológica de los diadenosina polifosfato como señales extracelulares, no existían datos bibliográficos acerca de su mecanismo de almacenamiento en las vesículas secretoras. En 1997, mediante una combinación de técnicas radiométricas y ensayos fluorimétricos, basados en el uso de eteno-derivados, se describió por primera vez el transporte de los diadenosina polifosfato a gránulos secretores, los gránulos cromafines (88). El transporte de diadenosina pentafosfato

(Ap₅A) a los gránulos pudo ser inhibido por otros diadenosina polifosfato (como el diadenosina trifosfato, Ap₃A, o el diadenosina tetrafosfato, Ap₄A) así como por los análogos no hidrolizables de ATP y ADP, adenosina 5'-O-(3-tio-trifosfato) (ATPγS) y adenosina 5'-O-(2-tio-difosfato) (ADPβS). El patrón inhibitorio de estos

análogos de nucleótido en el transporte de los diadenosina polifosfato sugiere que ambos tipos de sustancias, mono- y dinucleótidos de adenina, comparten un transportador vesicular común (88) (Figura 4).

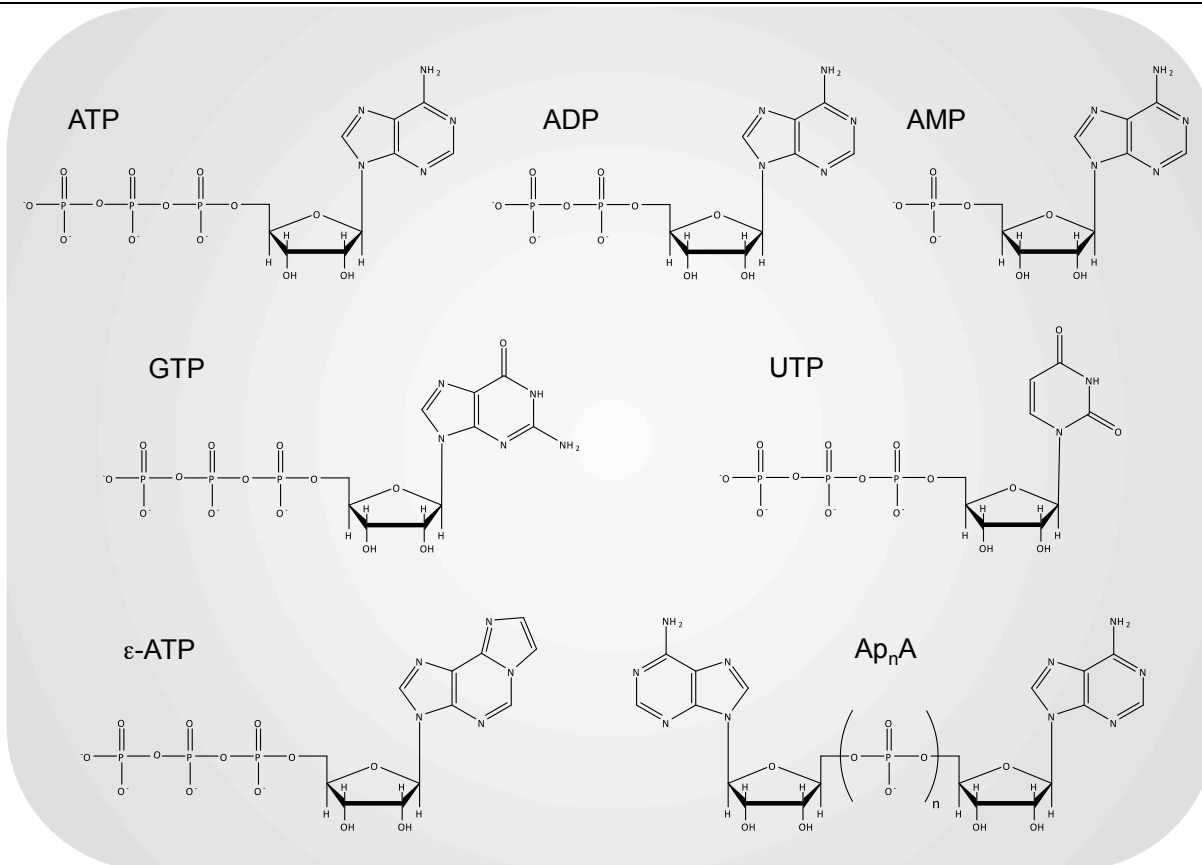


Figura 4. Estructura de los principales sustratos utilizados en la caracterización del transportador vesicular de nucleótidos.

También se han llevado a cabo ensayos del transporte de nucleótidos en gránulos cromafines “*ghosts*”. Estos “*ghosts*” son gránulos desprovistos de su contenido, por lisis osmótica, y después resellados. Se obtienen así vesículas con los mismos componentes de membrana que los gránulos pero sin su contenido soluble. Estas preparaciones presentan la desventaja de que solo una pequeña proporción de las membranas obtenidas por el choque osmótico se resellan correctamente (89). Sin embargo, permiten el control del medio intragranular requerido para algunos estudios de la biofísica del transporte y han sido ampliamente utilizados para la caracterización del transporte de catecolaminas a los gránulos cromafines (90). El empleo de estos “*ghosts*” permitiría el estudio del transporte vesicular de nucleótidos sin las posibles modificaciones introducidas por un hipotético intercambio de fosfato entre los nucleótidos intragranulares. En un primer estudio del transporte de nucleótidos empleando estas vesículas (91), se describió la existencia de un proceso de transporte por difusión, no saturable, independiente de Mg²⁺ y no inhibido por ADP. Posteriores trabajos incidieron en la existencia de un

proceso de difusión no saturable en estos gránulos “*ghosts*”, si bien la inhibición parcial del transporte de ATP por atractilósido y por sustancias que inhiben la ATPasa o disipan el gradiente de protones a través de la membrana, pondrían también de manifiesto la existencia, en estos gránulos “*ghosts*”, de un sistema de transporte activo. Sin embargo, la alta contribución de la difusión enmascararía la saturabilidad de este proceso (92). Estos resultados fueron puestos en entredicho tras la aparición de un trabajo que claramente describía la acumulación de ATP en estos orgánulos mediante un sistema de transporte dependiente de la actividad de la ATPasa granular (93). Al igual que ocurría con el transporte a gránulos intactos, el transporte a “*ghosts*” depende de la diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana, como pone de manifiesto el que el transporte sea inhibido por tiocianato pero no por el ion amonio. Otras características comunes con el mecanismo de transporte ya descrito en vesículas intactas serían la inhibición por atractilósido, así como la falta de especificidad, puesto que GTP y UTP pueden ser también transportados a los gránulos “*ghosts*”.

Los ensayos con gránulos “*ghosts*” aportaron datos

adicionales acerca del transporte vesicular de nucleótidos. El transporte de ATP es potenciado a bajas concentraciones de Cl^- , actuando este ion como un inhibidor a elevadas concentraciones. Asimismo, el transporte es inhibido por el ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS), un inhibidor del transporte de aniones (93). Ambas características son similares a las descritas para el

transporte vesicular de glutamato (3).

2.2. Transporte de nucleótidos a vesículas sinápticas

Al igual que ocurría en los gránulos cromafines, el ATP presente en las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico de *Torpedo* puede ser marcado tras la perfusión del tejido con una solución que contiene [^3H]adenosina (94).

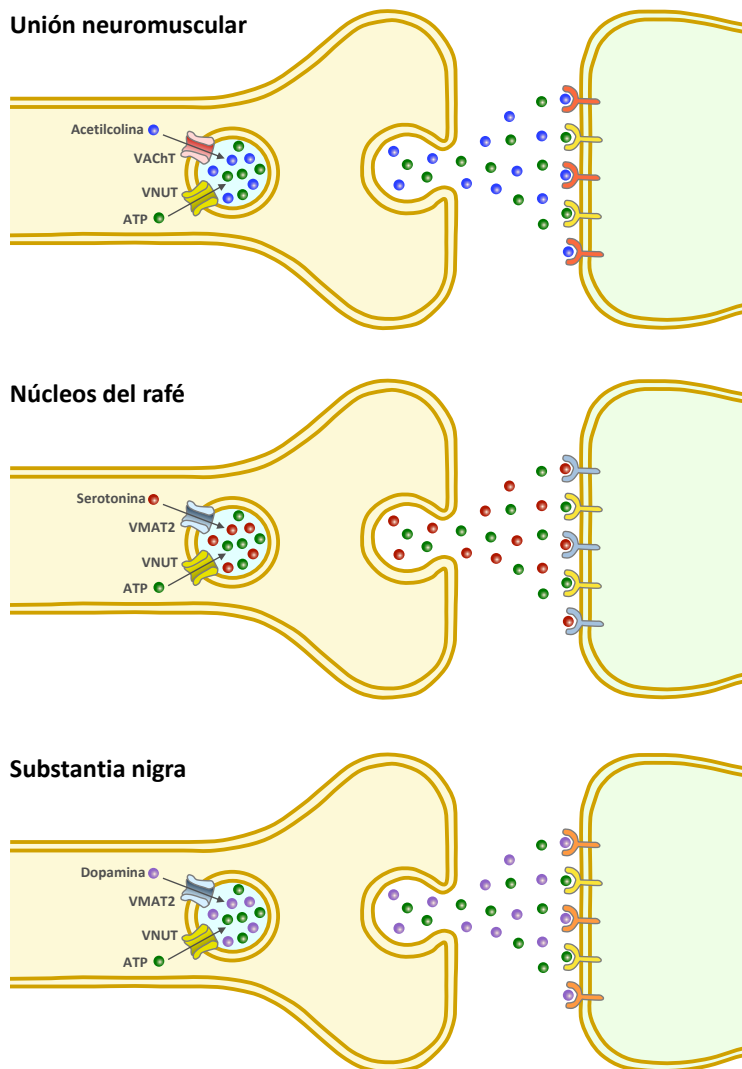


Figura 5. Transporte de nucleótidos a vesículas sinápticas. El ATP y otros nucleótidos son almacenados en vesículas sinápticas y son liberados conjuntamente con neurotransmisores clásicos, como la acetilcolina, la serotonina o la dopamina, en terminales nerviosas de la unión neuromuscular, los núcleos del raquí y la *substantia nigra*, respectivamente.

El estudio del transporte de nucleótidos a vesículas colinérgicas aisladas mostró un mecanismo de transporte saturable dependiente de la temperatura y el pH, características incompatibles con un proceso de difusión pasiva y que evidencian la existencia de un transportador. Además del ATP, también son buenos sustratos del transportador el ADP, AMP, GTP, GDP, GMP y UTP; sin embargo, la adenosina y la guanosina no son prácticamente transportadas al interior de las vesículas. El incremento en el valor de K_m y la disminución en la V_{max} al pasar de ATP a ADP y AMP, además de la

extremadamente pobre eficiencia en el transporte de adenosina, indican la importancia de los grupos fosfato para la actividad como sustrato. Por otro lado, la pérdida del grupo imidazolio (como ocurre con el UTP) también reduce el valor de V_{max} . No obstante, las modificaciones en la base nitrogenada del GTP, respecto del ATP, no parecen reducir la eficiencia del transporte. Al igual que ocurre en gránulos cromafines, el atracilósido actuó como un inhibidor del transporte de nucleótidos a vesículas sinápticas, sin afectar al transporte de acetilcolina (95).

En estudios más recientes, la misma aproximación

metodológica utilizada para caracterizar el transporte de nucleótidos a los gránulos cromafines, basada en el uso de eteno-derivados como sustratos del transporte (8, 88), fue aplicada al estudio del transportador presente en vesículas sinápticas aisladas de cerebro de rata (96). Este transportador mostró muchas similitudes con el descrito en los gránulos cromafines. Entre ellas, la inhibición del transporte por atracilósido y DIDS, si bien el inhibidor más efectivo del transporte de ϵ -ATP a las vesículas sinápticas fue el colorante azul de Evans (*Evans blue*) (96), un compuesto previamente descrito como un potente inhibidor del transportador vesicular de glutamato (97). Además, el transporte de ϵ -ATP a las vesículas es inhibido por los diadenosina polifosfato Ap₃A, Ap₄A, y Ap₅A, lo que sugiere que estos compuestos pudieran ser también sustratos del transportador, como se ha demostrado en el modelo de los gránulos cromafines (88). Finalmente, la presencia de ϵ -ATP en el interior de las vesículas tras el transporte de ϵ -ADP (96), indica la existencia de actividades enzimáticas intravesiculares de intercambio de grupos fosfato que equilibran los niveles de los distintos nucleótidos presentes en estos orgánulos, como se ha descrito también para los gránulos cromafines (8, 80, 82, 83).

2.3. Características cinéticas del transportador vesicular de nucleótidos. Comportamiento mnemónico

Cuando se analiza en un amplio rango de concentraciones de sustrato, el transporte de los eteno-nucleótidos (ϵ -ATP, ϵ -ADP y ϵ -AMP) a los gránulos cromafines no sigue una cinética de Michaelis-Menten. En

su lugar, se obtienen complejas curvas de saturación, no hiperbólicas, con varias etapas (8). La compleja dependencia de la velocidad de transporte con la concentración extragranular de los ϵ -nucleótidos, hizo necesario interpretar las curvas de saturación como la superposición de varias cinéticas sigmoides. Estos datos experimentales, por tanto, fueron procesados mediante la ecuación resultante de la suma de varias cinéticas tipo Hill (8):

$$V = \sum \frac{V_{\max} \cdot S^n}{K^n + S^n}$$

Los parámetros cinéticos de cada una de las curvas sigmoidales cuya adición da cuenta de las curvas de saturación experimentales para el transporte de los ϵ -nucleótidos a los gránulos cromafines, aparecen recogidos en la Tabla 1.

También el transporte de los diadenosina polifosfato a los gránulos cromafines muestra complejas curvas de saturación no hiperbólicas, cuando se estudia en un amplio rango de concentraciones de sustrato (88). La forma de estas curvas es similar a la observada para el transporte de ϵ -ATP, ϵ -ADP y ϵ -AMP, realizándose el análisis de los datos experimentales siguiendo el mismo criterio que para estos sustratos. Los parámetros cinéticos de las curvas sigmoides que son los constituyentes de las curvas de saturación experimentales para el transporte de los diadenosina polifosfato, aparecen también recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros cinéticos del transporte de nucleótidos y dinucleótidos a gránulos cromafines

	Curvas	ϵ -ATP	ϵ -ADP	ϵ -AMP	ϵ -Ap ₄ A	[³ H]Ap ₅ A
K (μ M)	1	250	150	200	16	16
	2	1000	900	1200	75	125
	3	3000	3600	3200	—	545
V_{\max} (pmol·min ⁻¹ ·mg prot. ⁻¹)	1	20	25	10	18	15
	2	40	35	40	13	8
	3	190	300	55	—	102
n_H	1	3	2	2	2	2
	2	4	4	3	4	4
	3	5	5	5	—	6

Parámetros cinéticos de las curvas cuya adición da cuenta de las curvas de saturación experimentales para el transporte de nucleótidos y dinucleótidos a los gránulos cromafines. K , V_{\max} y n_H representan, respectivamente, los valores de $S_{0,5}$, velocidad máxima parcial y número de Hill, para cada una de las curvas. Adaptado y modificado de (8, 88).

Estas complejas curvas cinéticas no pueden explicarse por la existencia de diferentes transportadores de nucleótidos en los gránulos cromafines. La superposición de distintos transportadores con sus respectivas afinidades es incompatible con la cooperatividad positiva mostrada

por las curvas de saturación. En enzimas alostéricas, la aparición de varias mesetas intermedias en las representaciones de V frente a $[S]_0$ ha sido explicada por la presencia de diferentes conformaciones del enzima, con distintas propiedades cinéticas, que se interconvierten

entre sí a través de isomerizaciones lentas inducidas por el sustrato. Las enzimas con este comportamiento cinético se denominan histeréticas o mnemónicas (98). En lo que se refiere a los transportadores, se ha descrito un comportamiento mnemónico en el caso del transportador equilibrativo de adenosina presente en la membrana plasmática de las células cromafines (99). La alta cooperatividad observada en el transporte de L-adenosina, con un coeficiente de Hill próximo a 5, solo podía ser explicada por la existencia de una forma multimérica del transportador, mínimo dimérica, con transiciones lentas entre distintos estados conformacionales de la proteína. El comportamiento cinético del transportador de nucleótidos de los gránulos cromafines ha sido explicado utilizando un modelo basado en el del transportador de adenosina (88). Sin embargo, se requiere un mayor grado de complejidad teniendo en cuenta la elevada cooperatividad, que puede alcanzar valores de número de Hill iguales a 6. Este hecho implica también la existencia de una forma dimérica del transportador, como requerimiento mínimo. Este modelo mnemónico para el transportador de nucleótidos de los gránulos cromafines ha sido confirmado mediante el uso de la técnica de citometría de flujo (87). Esta técnica ha sido adaptada al estudio del transporte vesicular mediante la medida del incremento en la fluorescencia asociada a los gránulos, debido a la internalización de los ϵ -nucleótidos en estas vesículas. El análisis por citometría de flujo del transporte de ϵ -ATP a los gránulos cromafines mostró también una compleja curva de saturación no hiperbólica (87), indicando que el peculiar comportamiento cinético descrito anteriormente no es debido a un artefacto experimental, sino que es una propiedad intrínseca del transportador granular. Por otro lado, el transporte de ϵ -ATP a vesículas sinápticas de cerebro muestra también una compleja cinética no hiperbólica con dos etapas (96). Este comportamiento cinético puede ser explicado basándose en un modelo mnemónico similar al descrito para el transporte de nucleótidos a los gránulos cromafines.

Respecto a la relevancia fisiológica que este mecanismo pueda tener, la existencia de este fenómeno mnemónico produce como resultado un mayor control de la capacidad de transporte por variaciones en la concentración de sustrato. Esta fina regulación de la actividad del transportador es esencial en el caso de un metabolito, como es el ATP, de tanta importancia en el metabolismo celular, y cuyos niveles citosólicos deben estar bajo estricto control para asegurar el correcto funcionamiento de la célula. El complejo comportamiento mnemónico del transportador vesicular permitiría el transporte de ATP al interior de las vesículas de manera altamente regulada (8). En el caso de los diadenosina polifosfato, no se conoce completamente su función en el interior de la célula. Sin embargo, sus niveles citosólicos se encuentran incrementados en células con una elevada actividad proliferativa o bajo ciertas condiciones, como el estrés ambiental, pudiendo estas sustancias actuar como señales en los procesos de decisión celular que conducen a proliferación, quiescencia, diferenciación o apoptosis

(100). El transporte de los diadenosina polifosfato a vesículas secretoras, además de regular la accesibilidad de estos compuestos al espacio extracelular, podría ser también un mecanismo para finalizar sus acciones citosólicas, lo que incrementa la relevancia fisiológica de este proceso de transporte.

2.4. Identificación del transportador vesicular de nucleótidos, VNUT. Propiedades bioquímicas.

La exploración de la base de datos del genoma humano permitió identificar un nuevo gen SLC17 (27). Este gen, *SLC17A9*, codifica una proteína de 430 aminoácidos con 12 hélices transmembrana. El análisis por *Northern blot* reveló que el gen *SLC17A9* se expresa en varios órganos pero es especialmente abundante en el cerebro, la glándula adrenal y la glándula tiroidea (27). Además, en la glándula adrenal, la proteína SLC17A9 es expresada específicamente en la médula y está asociada con los gránulos cromafines, como se reveló por ensayos de inmunohistoquímica, microscopía inmunoelectrónica y *Western blot* (27). Estos datos son consistentes con la hipótesis de que *SLC17A9* codifica el transportador de nucleótidos de los gránulos.

La proteína SLC17A9 humana fue expresada, purificada e incorporada en liposomas. Para ahuyentar al “demonio del transporte de ATP” se omitió la H^+ -ATPasa en los liposomas y se generó un $\Delta\psi$ (positivo en el interior), mediante la difusión de K^+ a los liposomas por la adición de valinomicina, con el fin de proporcionar la fuerza impulsora del transporte. Como se esperaba, la proteína SLC17A9 transporta activamente ATP a expensas de $\Delta\psi$ pero no de ΔpH . Esta proteína transporta varios nucleótidos, siendo el orden de eficacia $ATP > UTP > GTP > ITP, ADP \gg AMP$. La adenosina no es transportada por la proteína SLC17A9, mientras que el Ap_3A es un buen sustrato del transporte. La selectividad de sustrato de la proteína SLC17A9 coincide con el contenido de nucleótidos de los orgánulos que almacenan ATP (27). Además, SLC17A9 no transporta sustratos de otros miembros de la familia SLC17 como el glutamato, el aspartato o el ácido hipúrico, lo que apoya que la proteína SLC17A9 sea un transportador que específicamente reconoce un rango de nucleótidos como sustratos de transporte. El transporte mediado por SLC17A9 fue inhibido por DIDS y *Evans blue* (27) (Figura 6). El atracilósido es también un inhibidor parcial pero solo cuando el Mg^{2+} está presente en el medio de ensayo. Estas características son similares, si no idénticas, a las observadas en el transporte de nucleótidos a los gránulos cromafines y las vesículas sinápticas. Por otra parte, la proteína SLC17A9 se expresa de manera endógena en células de feocromocitoma PC12. La supresión de la expresión del gen *SLC17A9* mediante el uso de ARN de interferencia (ARNi) resulta en una disminución del almacenamiento y la liberación vesicular de ATP en estas células PC12. En conjunto, todos estos resultados demuestran que *SLC17A9* codifica un transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) (27).

Como se esperaba, VNUT requiere Cl^- para su actividad, no observándose el transporte de nucleótidos en ausencia de este ion (27). El Br^- también activa el transporte mientras que I^- , F^- , nitrato, sulfato o tiocianato fueron inefectivos. Además, los iones I^- , F^- , nitrato, sulfato y tiocianato inhiben el transporte de ATP dependiente de Cl^- . Este requerimiento de aniones es muy similar al de VGLUT2 (38). Aunque no se han llevado a cabo estudios cinéticos detallados, esto podría sugerir la existencia de sitios de unión de aniones y mecanismos de regulación similares en esta familia de transportadores SLC17. Otra característica remarcable de VNUT es que reconoce a los nucleótidos tanto en su forma libre como formando complejos con cationes divalentes, como se pone de manifiesto por el hecho de que el transporte de ATP no se ve afectado por la presencia o ausencia de Mg^{2+} o Ca^{2+} (27, 101). A diferencia de VNUT, otros transportadores de ATP, como el intercambiador ATP/ADP y el transportador Mg-ATP/Pi mitocondriales, son capaces de distinguir entre la forma libre y complejada del nucleótido (102, 103). Esto indica que VNUT posee unas propiedades cinéticas muy diferentes a las de otras proteínas que reconocen y unen ATP. Dado que la concentración citosólica de Mg^{2+} libre se encuentra aproximadamente en el rango milimolar, la mayoría del ATP transportado por VNUT debe ser ATP-Mg. Así en condiciones fisiológicas VNUT transporta concentraciones aproximadamente equimolares de ATP y Mg^{2+} a las vesículas secretoras. La supresión de la expresión del gen *VNUT* reduce el contenido vesicular de ATP y Mg^{2+} en una proporción similar. Estos resultados sugieren que VNUT está implicado en la acumulación de Mg^{2+} en los gránulos secretores (101). En el caso del Ca^{2+} , aunque el ATP también interacciona con este catión, la concentración libre de Ca^{2+} en condiciones fisiológicas (en el rango submicromolar) es muy inferior a la de Mg^{2+} (104, 105). Esto sugiere que el ATP citosólico formará complejo mayoritariamente con el Mg^{2+} , representando el complejo Ca-ATP menos de un 0,1% del total de las especies de ATP presentes en la célula. El transporte de esta pequeña fracción de Ca-ATP a través de VNUT no

puede dar cuenta de la relativamente elevada concentración de Ca^{2+} en el interior de las vesículas secretoras (101).

Se ha descrito que los cuerpos cetónicos, como el acetoacetato, compiten con el Cl^- por su unión a los VGLUTs y, por tanto, inhiben reversiblemente la actividad de transporte de estas proteínas (38). La inhibición por acetoacetato de estos transportadores lleva a una reducción del glutamato almacenado en las vesículas y a una disminución en la liberación exocitótica de este neurotransmisor (38), sugiriendo estos resultados que la neurotransmisión glutamatérgica se ve afectada por el estado metabólico del organismo. Una regulación similar por acetoacetato se observa también en otros miembros de la familia SLC17, como el VNUT (38) (Figura 6), lo que plantea la posibilidad de que la neurotransmisión purinérgica pueda ser también controlada por los cuerpos cetónicos. El efecto inhibitorio del acetoacetato sobre el VNUT se previene completamente por la incubación con una elevada concentración (100 mM) de Cl^- (38). El glioxilato, un metabolito de la glicina, se ha descrito recientemente como un inhibidor selectivo de VNUT (Figura 6). Este compuesto inhibe tanto a VNUT como a VGLUT2, pero la concentración de glioxilato requerida para el 50% de inhibición es de 620 μM , en el caso de VGLUT2, mientras que para VNUT esta concentración es de tan solo 4,1 μM (9). El glioxilato también inhibe el transportador vesicular de nucleótidos excitatorios, VEAT, otro miembro de la familia SLC17, en una extensión similar a VGLUT2, pero no ejerce ningún efecto sobre VMAT, VGAT o VACHT (38). VNUT también es inhibido selectivamente por el clodronato (Figura 6). Este bifosfonato actúa como un potente modulador alostérico que se une al sitio de regulación por Cl^- (106). Inhibidores de la liberación de ATP, como la glibenclamida, el ácido araquidónico, el ácido 18 α -glicirretínico, el ácido flufenámico y el A438079, también inhiben a VNUT (107).

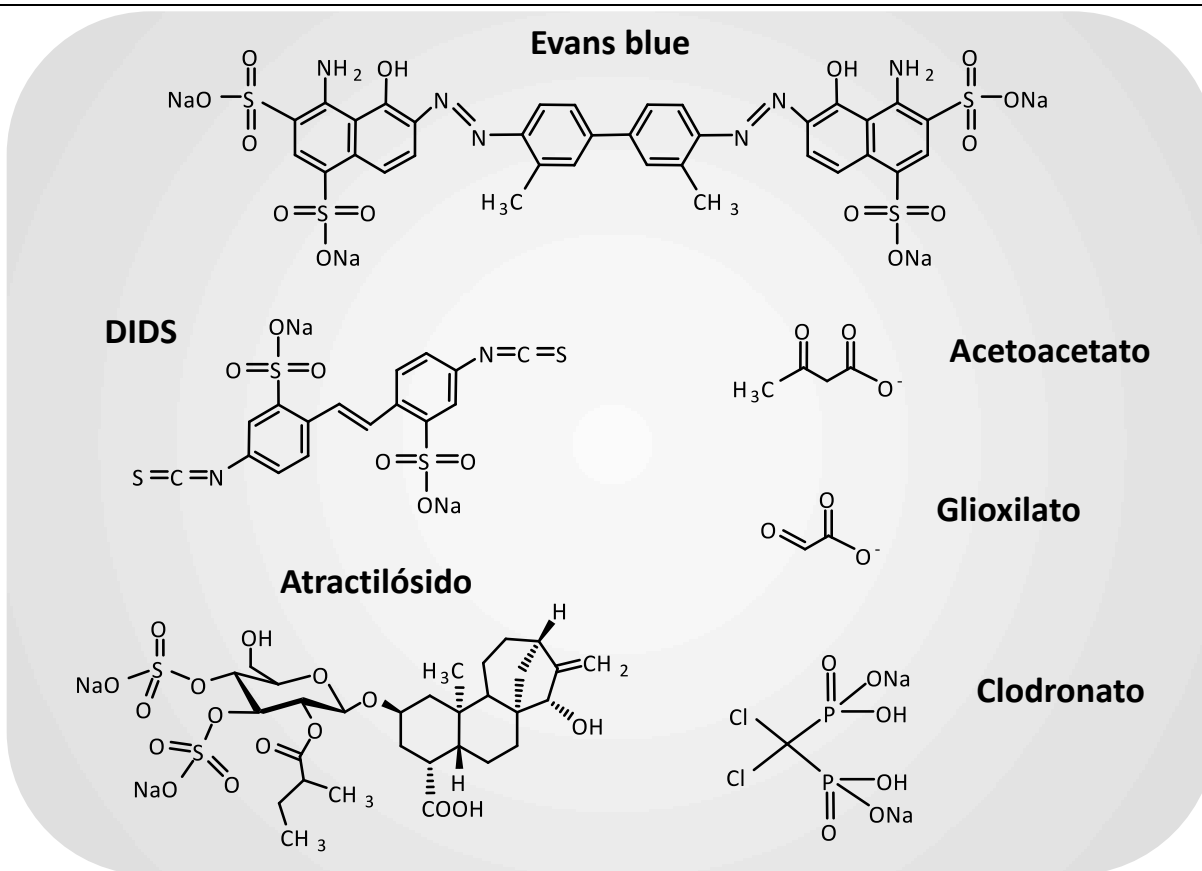


Figura 6. Estructura de los principales inhibidores del transportador vesicular de nucleótidos.

2.5. Localización y organización génica de SLC17A9. Ortólogos. Variantes de procesamiento alternativo.

El gen *SLC17A9* se localiza en el cromosoma 20 humano y contiene 14 exones y 13 intrones (27). La comparación de la secuencia de aminoácidos, mostró que la proteína SLC17A9 presenta un 23-29% de identidad y un 41-48% de similitud con otros miembros de la familia SLC17 (27). Secuencias ortólogas de este gen aparecen ampliamente distribuidas en el reino animal, incluyendo vertebrados, insectos, ascidias, hidras y nematodos (27). Otros eucariotas, como plantas, levaduras u hongos, no presentan el gen *SLC17A9*, aunque algunos de estos organismos sí tienen genes que codifican transportadores SLC17. A nivel de proteína, solo los VNUT de mamífero han sido caracterizados desde el punto de vista bioquímico y no hay información disponible de los homólogos VNUT en modelos experimentales como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* o el pez cebra, aunque los correspondientes genes han sido identificados (27, 108, 109). En los VNUT de mamífero, la mayor variabilidad se da en la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal, mientras que las regiones restantes, en particular la región transmembrana, están más conservadas (83% de identidad) (27).

Se ha descrito una variante de la proteína VNUT humana que es el resultado del procesamiento alternativo en la región amino terminal (110). En consecuencia, existen dos VNUTs, de 436 y 430 aminoácidos de

longitud, que han sido denominados VNUT-1 (identificador UniProt Q9BYT1-1) y VNUT-2 (identificador UniProt Q9BYT1-2), respectivamente. Los 19 o 13 residuos que comprende el extremo amino terminal, son únicos para cada variante. Sin embargo ambas formas comparten un 100% de homología en los restantes 417 aminoácidos (110). A día de hoy no está claro si esta diferencia en el extremo amino terminal puede conferir especificidad de tejido o afectar a la localización subcelular de la proteína.

2.6. Topología y residuos aminoácido esenciales.

El perfil hidropático de VNUT sugiere la presencia de 12 dominios transmembrana (27). Se cree que tanto su extremo amino como su extremo carboxilo terminal estarían orientados hacia el citosol, sobre la base de un estudio previo de la topología de membrana de VGLUT2 mediante el uso de anticuerpos dirigidos específicamente contra diferentes regiones de esta proteína (111). Los VGLUTs presentan regiones amino y carboxilo terminal relativamente largas que contienen motivos dileucina esenciales para la localización vesicular (112). En contraste, los extremos amino y carboxilo terminal de VNUT son muy cortos, y la secuencia de aminoácidos de estas regiones no se encuentra conservada entre los VGLUTs y dicho transportador.

Mediante ensayos de mutagénesis dirigida en VGLUT2 se ha determinado que la His128, en la segunda región

transmembrana, y la Arg184 y el Glu191, en la cuarta región transmembrana, son esenciales para el transporte de glutamato impulsado por $\Delta\psi$ (113). Entre estos residuos, la Arg184 está completamente conservada en todos los miembros de la familia SCL17, lo que indica que este residuo lleva a cabo una importante función común en todas estas proteínas, participando probablemente en el reconocimiento del sustrato aniónico o la activación por Cl⁻. Por el contrario, la His128 y el Glu191 están conservados en los VGLUTs pero no en muchos miembros de la familia SLC17, indicando que estos residuos tienen un papel específico en el transporte de glutamato. En VNUT, la sustitución de la Arg119, que se correspondería con la Arg184 del VGLUT2, por Ala, conduce a la pérdida completa de la actividad de transporte de nucleótidos (101), en concordancia con lo que se observa en los ensayos de mutagénesis en VGLUT2 (113). Sin embargo, cuando la Gln126, que se correspondería con el Glu191 de VGLUT2, es reemplazada por Ala, la proteína VNUT mutante retiene todavía aproximadamente un 50% de actividad (101), lo que indica que la Gln126 no es esencial para el transporte de nucleótidos. La Arg35, que se correspondería con la Arg88 de VGLUT2, es otro residuo con carga bien conservado entre los miembros de la familia SLC17. Sin embargo, la sustitución de la Arg35 por Ala en VNUT solo tiene un efecto moderado sobre el transporte de ATP (101). En conclusión, VNUT comparte con otros miembros de la familia SLC17 la presencia de un residuo de Arg, esencial para el transporte, en la cuarta región transmembrana. Sin embargo, otros residuos funcionalmente importantes, difieren de los de VGLUT2. Un modelo estructural de VGLUT, basado en la estructura cristalina del transportador bacteriano de glicerol 3 fosfato, muestra que los residuos esenciales, cuya sustitución causa una drástica disminución en la actividad de transporte de glutamato, estarían localizados próximos al fondo de una cavidad central formada por las hélices transmembrana (113, 114) y algo similar ocurriría también con su contrapartida en otros miembros de la familia SLC17. El tamaño, la forma y la disposición de los residuos con carga en esta área pueden determinar su selectividad de sustrato.

Una característica remarcable de los VGLUTs es que poseen una actividad intrínseca de transporte de fosfato inorgánico (113). Las características del transporte de fosfato difieren de las del transporte de glutamato en lo que se refiere a la fuerza motriz, la sensibilidad a inhibidores y la dependencia de Cl⁻. El transporte de fosfato es impulsado por un gradiente de sodio, mientras que el de glutamato utiliza la $\Delta\psi$. Además, a diferencia del transporte del glutamato, el transporte de fosfato no se ve afectado por el inhibidor *Evans blue* y es completamente activo incluso en ausencia de Cl⁻. Por otra parte, un exceso de glutamato no inhibe el transporte de fosfato dependiente de sodio y, a la inversa, el transporte de glutamato no se ve afectado por un exceso de fosfato. Asimismo, ninguna de las mutaciones de los tres residuos esenciales para el transporte de glutamato (Arg184, His128 y Glu191) tiene efecto alguno sobre el transporte de fosfato, lo que implica

que en estos dos procesos participan, al menos en parte, diferentes residuos aminoácido (113). Hasta la fecha no se tiene información sobre los residuos aminoácidos que son esenciales para el transporte de fosfato. Estos resultados muestran, por tanto, que los mecanismos moleculares del transporte de fosfato y glutamato son diferentes. Los investigadores están interesados en determinar como una misma molécula puede contener dos maquinarias de transporte independientes. Esta multifuncionalidad es una característica compartida también por otros miembros de la familia SLC17. Por ejemplo, NPT1 exhibe tanto una actividad de transporte de iones orgánicos impulsada por $\Delta\psi$, como una actividad de transporte de fosfato inorgánico dependiente de un gradiente de sodio (115). Por su parte, la sialina/VEAT muestra una actividad de transporte de glutamato y aspartato impulsada por $\Delta\psi$ cuando está presente en las vesículas sinápticas. Sin embargo cuando VEAT está presente en lisosomas funciona como un cotransportador de H⁺/ácido siálico (26). Hasta la fecha, se desconoce si VNUT pudiera disponer también de una maquinaria de transporte diferente de la que permite la internalización de los nucleótidos en vesículas.

2.7. VNUT es esencial para la liberación del ATP vesicular.

Una cuestión clave es determinar en qué medida contribuye VNUT a la liberación del ATP vesicular. La generación de ratones deficientes en el gen VNUT (VNUT^{-/-}) ha proporcionado una respuesta a dicha pregunta. Se ha demostrado que tanto el almacenamiento vesicular de ATP, como la liberación de ATP inducida por despolarización, desaparecen completamente en neuronas aisladas de hipocampo de los ratones VNUT^{-/-} (116). Igualmente, la actividad de transporte vesicular de ATP está ausente en los gránulos cromafines aislados de la glándula adrenal de los ratones VNUT^{-/-}, de manera que las células cromafines de estos ratones pierden la capacidad de liberar ATP tras la estimulación con altas concentraciones de K⁺ (116). En los islotes de Langerhans, VNUT está asociado con los gránulos que contienen insulina de las células β y dichos islotes liberan cantidades apreciables de ATP tras la estimulación con altas concentraciones de glucosa. Sin embargo, no se observa la secreción de ATP estimulada por glucosa en los islotes aislados de los ratones VNUT^{-/-} (116). Asimismo, la liberación de ATP de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal o del epitelio de la vejiga, también desaparece en los ratones VNUT^{-/-} (117, 118). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que VNUT es responsable del almacenamiento vesicular de ATP y es un componente esencial para la liberación del ATP vesicular en un gran número de células, incluyendo neuronas y algunas células neuroendocrinas.

Inesperadamente, en ratón, la deficiencia de VNUT no es letal, y los animales son viables y no muestran alteraciones en términos de aumento de peso, tamaño corporal, morfología, ingesta de alimentos y agua, consumo de oxígeno, emisión de dióxido de carbono, tasa

de intercambio respiratorio, así como en actividad locomotora o comportamiento en los test de campo abierto y laberinto en cruz (116). El descubrimiento de este fenotipo contrarió a los expertos en el campo de la señalización purinérgica, pues revelaba que la liberación de ATP vesicular no es esencial para el mantenimiento de la vida, una pesadilla para casi todos los estudiosos de este área. Aunque quizás esta liberación dependiente de VNUT sea esencial, pero otros factores que son regulados al alza o a la baja podrían compensar, de alguna manera los efectos de la deficiencia del gen *VNUT*.

2.8. Expresión y función de VNUT.

El transportador vesicular de nucleótidos se ha identificado en distintos tejidos y tipos celulares, sugiriendo su implicación en diferentes funciones fisiológicas. Su expresión ha sido descrita mayoritariamente en el sistema nervioso, tanto central como periférico, y en el sistema neuroendocrino.

2.8.1. Neuronas, astrocitos y microglía

En cerebro, la distribución de VNUT es bastante amplia, observándose una elevada expresión en zonas como el hipocampo, el bulbo olfativo y el cerebelo (119) (Figura 7).

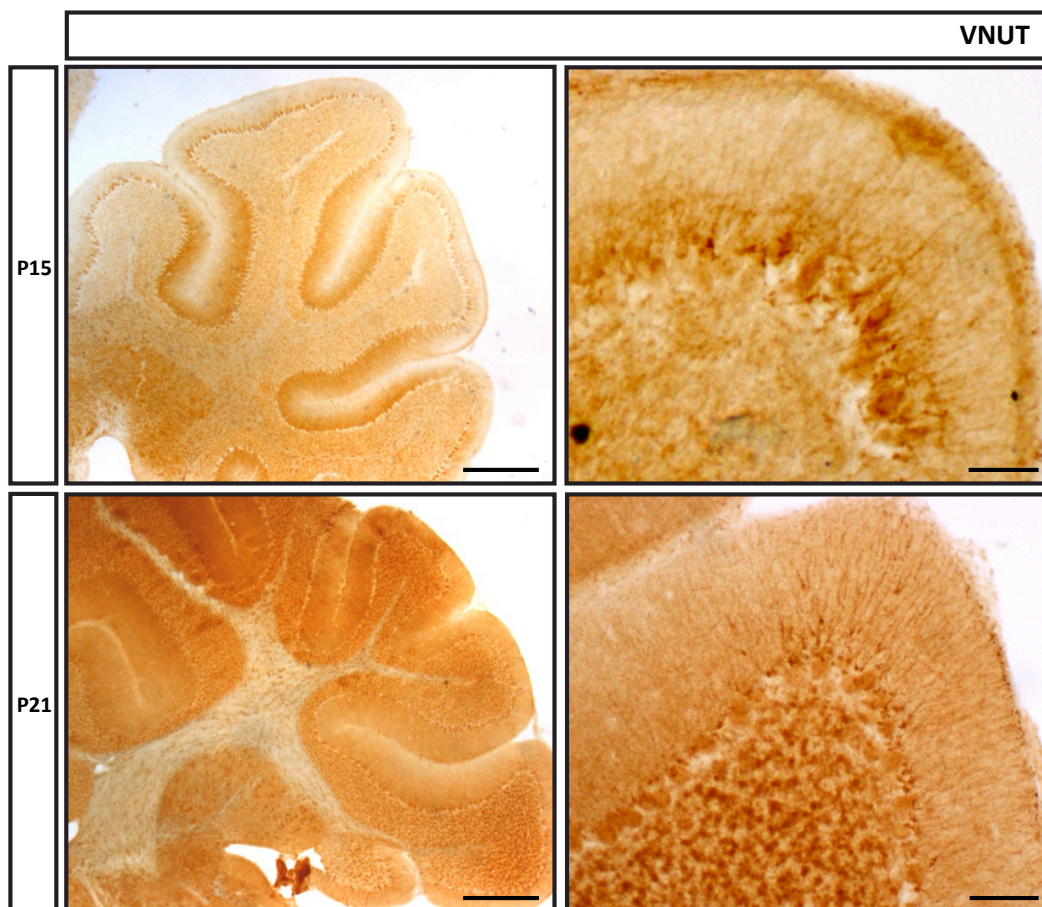


Figura 7. Distribución del transportador VNUT en etapas postnatales del desarrollo del cerebelo. Microfotografías representativas mostrando el marcaje con VNUT en los estadios P15 y P21. Escala 300 μm . En la columna derecha se muestra una región de cada etapa analizada a mayor aumento. Escala 50 μm .

En neuronas de hipocampo, VNUT está asociado con las vesículas sinápticas en terminales excitatorias e inhibitorias, además de estar presente en dendritas postsinápticas y axones pre-terminales (119). Así mismo, se ha observado la presencia de VNUT en una subpoblación de las vesículas sinápticas que contienen VGLUT1 (119), lo que indica que dichas vesículas almacenan ATP y glutamato, pudiendo darse una

liberación simultánea de ambos neurotransmisores por parte de ciertas poblaciones vesiculares. VNUT también se expresa en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* y el área tegmental ventral, lo que sugiere que estas neuronas son una fuente de ATP extracelular, así como de sus productos de degradación, como el ADP o la adenosina (120). Dado que esta clase de neuronas modulan un amplio rango de comportamientos, como el control motor,

motivación o recompensa (121-124), la neurotransmisión purinérgica podría participar en estas vías. Así mismo, la transmisión purinérgica podría jugar un papel en

desórdenes neurológicos que implican la disregulación de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, como es la enfermedad de Parkinson (125).

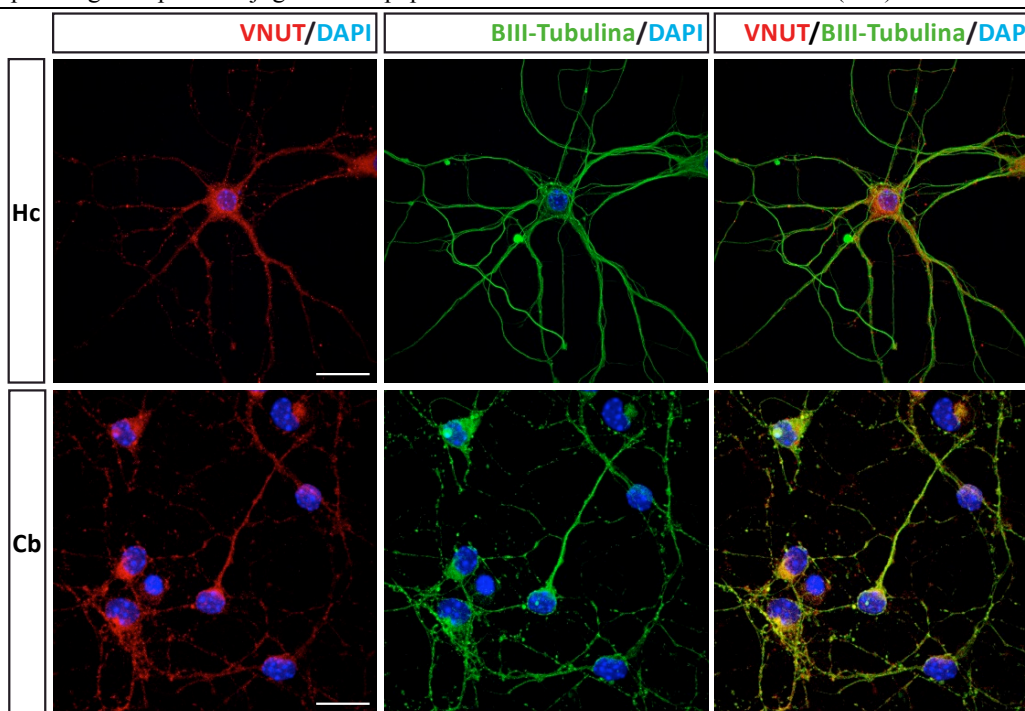


Figura 8. Identificación de VNUT en distintas poblaciones neuronales. Microfotografías representativas que muestran la presencia de VNUT (rojo) en cultivos de neuronas de hipocampo (Hc) y de neuronas granulares de cerebelo de ratón (Cb) a día 7 *in vitro*. Las neuronas se marcaron con la proteína citoesquelética βIII-tubulina (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 20 μm.

VNUT también podría estar implicado en los procesos de diferenciación neural y elongación axonal. En neuronas de hipocampo embrionario, que presentan receptores P2X7 funcionales localizados principalmente en el cono de crecimiento axonal, la presencia de ATP extracelular, y su efecto sobre los receptores P2X7, reduce el crecimiento del axón. En contraste, tanto la degradación del ATP por acción de ectonucleotidasas, como el silenciamiento de la expresión del receptor P2X7 o su bloqueo farmacológico, incrementa la longitud axonal (126). La presencia de ATP extracelular está ligada a su almacenamiento vesicular y su disponibilidad para ser liberado, lo que sugiere un papel del transportador vesicular VNUT en los procesos de neuritogénesis y diferenciación neuronal. En este sentido, se ha analizado el efecto de la expresión o silenciamiento de VNUT en el proceso de neuritogénesis que ocurre en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras el tratamiento con ácido retinoico. La expresión de VNUT reduce el número y la longitud de las neuritas en estas células, un efecto que es revertido por el silenciamiento de la expresión de este transportador (127).

Los astrocitos y la microglía son otros tipos celulares que secretan ATP en el cerebro. La liberación de ATP por los astrocitos puede inducir la propagación de ondas de calcio en estas células gliales y modular la actividad de las neuronas (128-130). Sin embargo, los mecanismos que regulan la liberación de ATP por estas células no son bien

conocidos, habiéndose descrito en los astrocitos una liberación de ATP tanto dependiente como independiente de Ca^{2+} . La liberación de ATP dependiente de Ca^{2+} de los astrocitos podría utilizar un mecanismo similar a la exocitosis regulada por Ca^{2+} de las vesículas sinápticas. De hecho, la liberación de ATP es dependiente del incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y los astrocitos poseen varios tipos de vesículas secretoras, incluyendo vesículas de tipo sináptico, vesículas de núcleo denso y lisosomas secretores (131). En astrocitos corticales, VNUT se localiza principalmente en los lisosomas secretores, llevando a cabo el almacenamiento de ATP en estos orgánulos. La inhibición de VNUT por *Evans blue*, así como la reducción de su expresión mediante el uso de ARN de interferencia, reduce la cantidad de ATP liberada de manera dependiente de Ca^{2+} por los astrocitos, mientras que la sobreexpresión de VNUT incrementa dicha liberación (132). En el caso de la microglía, la localización de VNUT difiere, ya que no se ha observado su presencia en los lisosomas (133). Además, en la línea celular microglial MG5, la expresión del transportador aumenta tras el tratamiento con el lipopolisacárido bacteriano (LPS), produciéndose una mayor liberación de ATP (133). Este hecho es de suma importancia, ya que en situaciones como daño cerebral traumático o infección, la microglía podría incrementar la liberación exocitótica de ATP mediante el aumento de la expresión de VNUT. Se ha

demostrado que el ATP y otros nucleótidos extracelulares llevan a cabo un importante papel en la regulación de la migración, la extensión de procesos y la fagocitosis en la microglía (134-136). El incremento en la liberación de ATP, actuando como una señal autocrina, podría acentuar estos comportamientos microgliales. Por otra parte, cuando se expone al compuesto neurotóxico metilmercurio, la microglía excita ATP, el cual, al activar a los receptores

P2Y₁ presentes en los astrocitos, produce la secreción de la citoquina neuroprotectora interleuquina-6 (IL-6). En ratones *VNUT*^{-/-}, la respuesta ante el metilmercurio no se produce, indicando el papel que desempeña este transportador en la comunicación celular entre microglía y astrocitos (137).

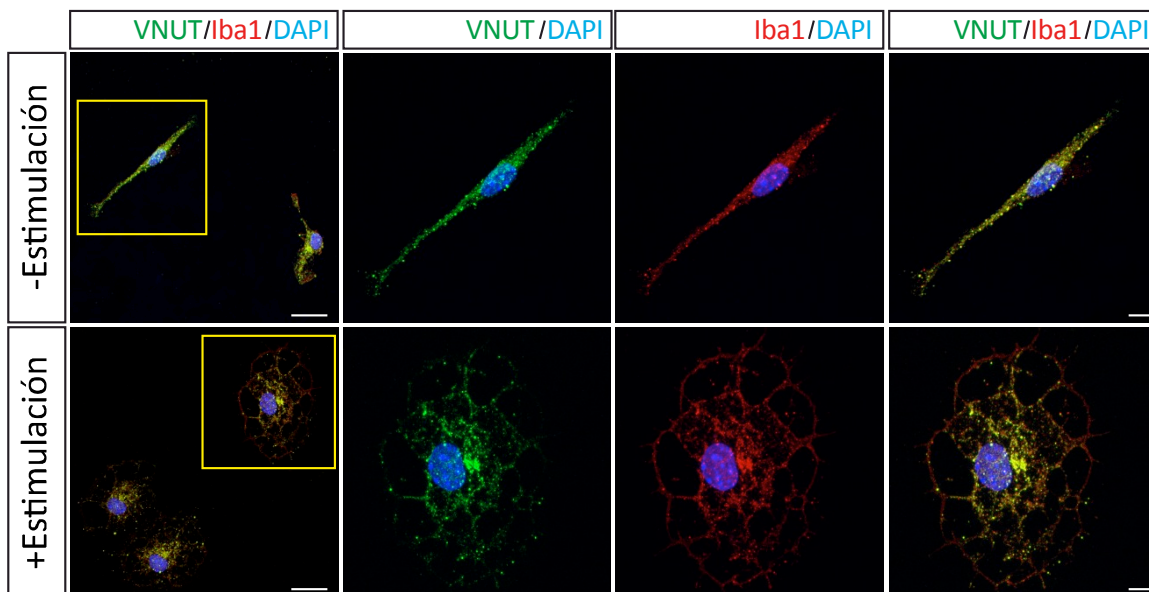


Figura 9. Identificación de VNUT en células de la microglía. Microfotografías representativas de células microgliales quiescentes (paneles superiores) y tratadas con un estímulo activador, el lipopolisacárido bacteriano (LPS), durante 24 horas (paneles inferiores). Las células se marcaron con VNUT (verde) e Iba-1 (rojo), mostrándose la superposición de ambos marcajes. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 15 μ m. El recuadro muestra una célula ampliada. Escala 5 μ m.

En la médula espinal se ha relacionado a VNUT con el dolor neuropático, una hipersensibilidad al dolor que se produce tras el daño de un nervio periférico a consecuencia de una lesión traumática o como resultado de enfermedades como el cáncer, la diabetes mellitus o la esclerosis múltiple. Una serie de evidencias ponen de manifiesto el papel de las células de la microglía de la médula espinal en el desarrollo del dolor neuropático. Tras el daño de un nervio periférico, la microglía espinal cambia a un estado reactivo, a través de una secuencia de cambios celulares y moleculares, que incluyen el incremento en la expresión de genes que codifican receptores purinérgicos, como el P2X₄ o el P2Y₁₂. En respuesta a la estimulación de estos receptores, la microglía libera una serie de factores bioactivos que producen una alteración en la neurotransmisión en las vías nociceptivas del asta dorsal de la médula espinal. Estas alteraciones patológicas causan una hipersensibilidad que convierte estímulos inicialmente inocuos en señales nociceptivas (138, 139). Recientemente, Inoue y sus colaboradores han demostrado que VNUT y la liberación de ATP vesicular dependiente de VNUT están implicados en la generación y mantenimiento del dolor neuropático (118). En ratones *VNUT*^{-/-} no se observa un incremento en el ATP extracelular en la médula espinal tras el daño de un

nervio periférico, cosa que si ocurre en los ratones control, y la hipersensibilidad al dolor está atenuada. Este fenotipo se observa en ratones en los que se ha suprimido la expresión de VNUT específicamente en las neuronas del asta dorsal, pero no en animales que carecen de VNUT en neuronas sensoriales, astrocitos o microglía. Estos resultados indican que la liberación de ATP vesicular de las neuronas del asta dorsal es esencial para el dolor neuropático (118). En modelos de rata en los que se les produce una lesión de uno de los nervios espinales, se ha observado que hay un incremento de la expresión de VNUT en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (neuronas DRG) (140). Además, VNUT colocaliza con la proteína lisosomal LAMP1 en estas neuronas, lo que sugiere que el almacenamiento de ATP en los lisosomas está activado en estas células. El marcaje de los lisosomas con una proteína fluorescente ha permitido comprobar que los lisosomas son transportados a las terminales centrales de las células DRG. En este estudio, los autores sugieren que una fuente adicional de ATP, que conduzca a la activación de la microglía en el asta dorsal de la médula, tras una lesión nerviosa, podría ser la exocitosis de los lisosomas de las terminales nerviosas centrales de las neuronas DRG (140). De igual forma, VNUT podría tener un papel clave en el dolor neuropático del nervio

trigémico, dado que modula la comunicación purinérgica entre las células satélite gliales y las neuronas del ganglio del trigémico. En un modelo de hiperalgnesia, se observó la mutua activación de ambos tipos celulares por un mecanismo dependiente de ATP (141). Todos estos resultados han llevado a proponer el uso de inhibidores de VNUT, con el fin de reducir la liberación de ATP vesicular, para el tratamiento del dolor neuropático (106).

En la retina de ratón, VNUT está presente en las células fotorreceptoras, en las neuronas bipolares y amacrinas, así como en los astrocitos y las células de Müller (142), indicando que la liberación de ATP es mediada por estas células para iniciar la transmisión química purinérgica. En el caso de las células amacrinas que expresan VNUT, éstas son de naturaleza dopaminérgica, lo que parece indicar que podrían coliberar ATP junto con el neurotransmisor dopamina (120). Los niveles de ATP extracelular y de expresión de VNUT se encuentran incrementados en retinas glaucomatosas (143), sugiriendo la implicación del transportador en la progresión de esta patología, así como el papel que juega el ATP en la disfunción de la retina, posiblemente a través de la activación del receptor P2X7.

En el sistema nervioso periférico, se ha visto que VNUT está presente en los lisosomas de las células de Schwann y que su expresión aumenta en el fenómeno conocido como degeneración Walleriana (144), la degeneración que se produce en la parte distal de un axón tras un daño que conduzca a una separación entre el axón y el cuerpo celular. En explantes de nervio ciático en los que se produce la lesión axonal, la liberación de ATP por parte de las células de Schwann parece ser a través de la exocitosis de los lisosomas, donde VNUT participaría en el almacenamiento previo del nucleótido en dichas vesículas.

2.8.2. Páncreas

En el tejido pancreático, VNUT se encuentra tanto en la zona exocrina como en la endocrina. En la primera, se le ha relacionado con el almacenamiento de ATP junto con las enzimas digestivas en los gránulos de zimógenos de los acinos pancreáticos (145), produciéndose su liberación tras un estímulo colinérgico (146). En el páncreas endocrino, VNUT está presente en los gránulos de insulina de las células β de los islotes de Langerhans. Estos orgánulos tienen, por tanto, la capacidad de almacenar el ATP y liberarlo tras la estimulación de los islotes con glucosa. Consecuentemente con estos resultados, la supresión en la expresión de VNUT en las células β reduce significativamente la liberación de ATP dependiente de glucosa (116, 147). Sin embargo, existe cierta controversia sobre el papel del ATP liberado en la regulación de la secreción de insulina. Geisler y colaboradores mostraron que la reducción en la expresión de VNUT, mediante el uso de ARN de interferencia, en células MIN6 (una línea celular derivada de insulinoma), o en islotes aislados de ratón, conduce a una disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, de *glucose-stimulated insuline secretion*). Además, el bloqueo

farmacológico de VNUT, mediante el uso del inhibidor *Evans Blue*, también reduce la GSIS de manera dependiente de concentración. El tratamiento con ATP exógeno revierte de manera efectiva el déficit en la secreción de insulina inducido tanto por el silenciamiento de la expresión de VNUT como por su inhibición funcional (147). Estos resultados parecen indicar que la liberación de ATP mediada por VNUT es esencial para la secreción normal de insulina en los islotes pancreáticos. Por otra parte, la sobreexpresión de VNUT en las células β , que conduce a una mayor liberación de ATP, induce asimismo un aumento en la secreción de insulina (147). Estos resultados indican que el ATP liberado por los islotes actuaría como un mecanismo de retroalimentación, facilitando la liberación de insulina. En aparente contradicción con el trabajo anterior, un estudio llevado en ratones *VNUT^{-/-}* muestra que la liberación de insulina en respuesta a glucosa en islotes aislados de estos ratones es aproximadamente 1,5 veces mayor que la que se observa en los islotes de ratones control. Además, la adición de bajas concentraciones de ATP inhibe la liberación de insulina estimulada por glucosa en islotes tanto de los ratones *VNUT^{-/-}* como de los animales control. Estos resultados indicarían que la secreción de insulina en los islotes pancreáticos es regulada negativamente por ATP (116). Por otra parte, el ratón *VNUT^{-/-}* exhibe hipoglucemia, así como un aumento en la sensibilidad a la insulina. Un incremento en los niveles de fosforilación de la Akt hepática, una proteína clave en la cascada de señalización de la insulina, podría explicar la mayor sensibilidad a la insulina en los ratones *VNUT^{-/-}* (116). A pesar de la discrepancia entre estos estudios, que puede ser consecuencia de las diferentes aproximaciones metodológicas utilizadas, todos estos resultados ponen de manifiesto que VNUT desempeña una importante función en la homeostasis de la glucosa, a través de la regulación de los niveles de insulina y de la sensibilidad a la misma.

2.8.3. Botones gustativos

Las células gustativas son células epiteliales quimiosensoriales, responsables de la percepción del sabor, que se clasifican en tres grupos: células de tipo I, II y III. Las células de tipo II expresan receptores acoplados a proteínas G que responden a azúcares, compuestos amargos y aminoácidos y son responsables de la percepción de los sabores dulce, amargo y umami. Estas células transmiten la señal del sabor a los nervios gustativos que llevan esa información al sistema nervioso central. Una cuestión sin resolver en este sistema es cómo las células de tipo II transducen la señal del sabor a los nervios gustativos, ya que no forman sinapsis convencionales con las neuronas. Sin embargo se sabe que la señalización por ATP es esencial para esta comunicación celular (148). Un estudio reciente ha demostrado que las células de tipo II secretan ATP a través del modulador 1 de la homeostasis del calcio, CALHM1, un canal iónico de la membrana plasmática permeable a ATP. Ratones deficientes en esta proteína pierden tanto la capacidad de liberar ATP de las células de tipo II, como la

capacidad de percibir los sabores dulce, amargo y umami (149). Mediante técnicas de inmunofluorescencia, se ha observado que en los botones gustativos VNUT se expresa selectivamente en las células de tipo II. Además, cuando se analiza el desarrollo de la lengua tras el nacimiento, se observa que VNUT muestra un patrón de expresión temporal y espacial que se correlaciona con el de marcadores específicos de las células de tipo II (150). La supresión de la expresión de VNUT no afecta a la percepción de los sabores dulce, amargo y umami (151). Sin embargo, el análisis por microarray de la expresión de genes en botones gustativos de ratones *VNUT*^{-/-} indica que los niveles de expresión de algunos componentes de la señalización GABAérgica están marcadamente disminuidos. En particular, la expresión de *Gabrg1*, una subunidad de los receptores de GABA, disminuye a una centésima parte de la que se observa en los botones gustativos de los animales control. Además, la expresión de *Gad2*, un enzima que sintetiza GABA, disminuye a un tercio de la observada en los botones gustativos control.

2.8.4. Vejiga urinaria

La vejiga urinaria posee un mecanismo de transducción mecanosensorial purinérgico para regular el reflejo miccional. El urotelio de la vejiga secreta ATP durante la distensión de la vejiga y el uréter, y esto estimula los receptores P2X3 y P2X2/3 en las fibras nerviosas aferentes suburoteliales (152). Recientemente se ha encontrado que el epitelio de la vejiga expresa VNUT en vesículas fusiformes/discoidales. La liberación de ATP vesicular está implicada en la relajación de la vejiga promovida por el almacenamiento de la orina durante la fase temprana de llenado, mediante la estimulación de receptores P2 en los nervios sensoriales suburoteliales. En la vejiga de ratones *VNUT*^{-/-}, la liberación vesicular de ATP se encuentra alterada, observándose una reducción en la capacidad de acomodación de la vejiga desde la fase temprana de almacenamiento y mostrando estos animales una micción frecuente (117). Cabe señalar que la liberación de ATP vesicular ocurre cuando la estimulación es débil (distensión débil) en una fase temprana de llenado. Por otra parte, una fuerte estimulación, es decir, una fuerte distensión, provoca la liberación de ATP a través de múltiples mecanismos. Estos incluyen hemicanales de conexina en una fase tardía de llenado, estimulando receptores P2 en las células intersticiales, miofibroblastos o fibras nerviosas aferentes para facilitar la transmisión de las señales de llenado de la vejiga al sistema nervioso central. Por lo tanto, la vejiga utiliza sistemas de liberación de ATP dependientes de VNUT o mediados por hemicanales para el almacenamiento de la orina y el control de la micción.

2.9. Conclusiones

Está ampliamente aceptado que VNUT es el responsable del almacenamiento de ATP y otros nucleótidos en vesículas de diferentes células secretoras y, por tanto, juega un papel clave en la liberación de los nucleótidos vesiculares y el inicio de la transmisión

química purinérgica. Tanto la reducción de la expresión de VNUT, como la inhibición de su actividad, reducen la liberación de ATP vesicular y conducen a una disminución en la señalización química purinérgica. Sin embargo, la liberación neta de ATP de las células muestra unas características complejas, ya que tanto la liberación de ATP vesicular como la liberación a través de canales iónicos permeables a ATP en la membrana plasmática, parecen participar en este proceso. La regulación al alza de los canales permeables a ATP podría compensar en cierta medida los efectos de la supresión de la expresión de VNUT en los animales transgénicos deficientes en esta proteína. En conjunto, las evidencias obtenidas de los ratones *VNUT*^{-/-} indican que la liberación de ATP vesicular está implicada en la modulación de la neurotransmisión y la regulación de la función endocrina, el metabolismo y la percepción química. La deficiencia en la liberación vesicular de ATP podría tener un efecto beneficioso en ciertas condiciones patológicas. En particular, los ratones deficientes en VNUT muestran resistencia al dolor neuropático y se observa también un efecto terapéutico frente a la diabetes, a través del incremento en la sensibilidad a insulina. Por tanto, VNUT podría constituir una nueva diana molecular en la fisiopatología de la transmisión purinérgica. La disminución en la señalización purinérgica, mediante la inhibición de la actividad de VNUT o la reducción de la expresión del gen *VNUT*, podría ser utilizada con fines terapéuticos.

3. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación de la Fundación Ramón Areces (PR2018/16-02), del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BFU2014-53654-P) y de la Comunidad de Madrid (BRADECM S2013/ICE-2958). Felipe Ortega es investigador contratado a través del programa Ramón y Cajal (RYC-2013-13290).

4. REFERENCIAS

1. Blakely RD, Edwards RH. Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a005595.
2. Omote H, Miyaji T, Hiasa M, *et al.* Structure, Function, and Drug Interactions of Neurotransmitter Transporters in the Postgenomic Era. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016; 56: 385-402.
3. Omote H, Moriyama Y. Vesicular neurotransmitter transporters: an approach for studying transporters with purified proteins. *Physiology (Bethesda)* 2013; 28: 39-50.
4. Chen L, Ding Y, Cagniard B, *et al.* Unregulated cytosolic dopamine causes neurodegeneration associated with oxidative stress in mice. *J Neurosci* 2008; 28: 425-33.
5. Pifl C, Rajput A, Reither H, *et al.* Is Parkinson's disease a vesicular dopamine storage disorder? Evidence from a study in isolated synaptic vesicles of human and nonhuman primate striatum. *J Neurosci* 2014; 34: 8210-8.

6. Caudle WM, Colebrooke RE, Emson PC, *et al.* Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. *Trends Neurosci* 2008; 31: 303-8.
7. Johnson RG, Jr. Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 1988; 68: 232-307.
8. Gualix J, Abal M, Pintor J, *et al.* Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J Biol Chem* 1996; 271: 1957-65.
9. Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, *et al.* Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol Rep* 2014; 2: e12034.
10. Anlauf M, Schafer MK, Depboylu C, *et al.* The vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) is expressed by normal and tumor cutaneous mast cells and Langerhans cells of the skin but is absent from Langerhans cell histiocytosis. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 779-88.
11. Thomas-Reetz A, Hell JW, During MJ, *et al.* A gamma-aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5317-21.
12. Morimoto R, Uehara S, Yatsushiro S, *et al.* Secretion of L-glutamate from osteoclasts through transcytosis. *EMBO J* 2006; 25: 4175-86.
13. Reimer RJ. SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 350-9.
14. Hiasa M, Miyaji T, Haruna Y, *et al.* Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci Rep* 2014; 4: 6836.
15. Eiden LE, Schafer MK, Weihe E, *et al.* The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch* 2004; 447: 636-40.
16. Gasnier B. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch* 2004; 447: 756-9.
17. Njus D, Kelley PM, Harnadek GJ. Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1986; 853: 237-65.
18. Whittaker VP. Cholinergic synaptic vesicles from the electromotor nerve terminals of Torpedo. Composition and life cycle. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 493: 77-91.
19. Muench SP, Trinick J, Harrison MA. Structural divergence of the rotary ATPases. *Q Rev Biophys* 2011; 44: 311-56.
20. Toei M, Saum R, Forgac M. Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry* 2010; 49: 4715-23.
21. Parsons SM. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J* 2000; 14: 2423-34.
22. Van Liefvering J, Massie A, Portelli J, *et al.* Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy? *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 139.
23. Preobraschenski J, Zander JF, Suzuki T, *et al.* Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter. *Neuron* 2014; 84: 1287-301.
24. Juge N, Muroyama A, Hiasa M, *et al.* Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl⁻/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J Biol Chem* 2009; 284: 35073-8.
25. Reimer RJ, Edwards RH. Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch* 2004; 447: 629-35.
26. Miyaji T, Echigo N, Hiasa M, *et al.* Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 11720-4.
27. Sawada K, Echigo N, Juge N, *et al.* Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5683-6.
28. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, *et al.* Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 1997; 389: 870-6.
29. Farsi Z, Preobraschenski J, van den Bogaart G, *et al.* Single-vesicle imaging reveals different transport mechanisms between glutamatergic and GABAergic vesicles. *Science* 2016; 351: 981-4.
30. Egashira Y, Takase M, Watanabe S, *et al.* Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 10702-7.
31. Omote H, Miyaji T, Juge N, *et al.* Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry* 2011; 50: 5558-65.
32. Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremerey RT, Jr., *et al.* Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 2000; 289: 957-60.
33. Tabb JS, Kish PE, Van Dyke R, *et al.* Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem* 1992; 267: 15412-8.
34. Bai L, Xu H, Collins JF, *et al.* Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 2001; 276: 36764-9.
35. Naito S, Ueda T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 1985; 44: 99-109.
36. Knoth J, Zallakian M, Njus D. Stoichiometry of H⁺-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. *Biochemistry* 1981; 20: 6625-9.
37. Nguyen ML, Cox GD, Parsons SM. Kinetic

- parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. *Biochemistry* 1998; 37: 13400-10.
38. Juge N, Gray JA, Omote H, *et al.* Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 2010; 68: 99-112.
 39. Alfonso A, Grundahl K, Duerr JS, *et al.* The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* 1993; 261: 617-9.
 40. Wojcik SM, Katsurabayashi S, Guillemin I, *et al.* A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* 2006; 50: 575-87.
 41. Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, *et al.* A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 5442-51.
 42. Farnsworth SJ, Volz TJ, Hanson GR, *et al.* Cocaine alters vesicular dopamine sequestration and potassium-stimulated dopamine release: the role of D2 receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 807-12.
 43. Volz TJ, Fleckenstein AE, Hanson GR. Methamphetamine-induced alterations in monoamine transport: implications for neurotoxicity, neuroprotection and treatment. *Addiction* 2007; 102 Suppl 1: 44-8.
 44. Winter S, Brunk I, Walther DJ, *et al.* Galphao2 regulates vesicular glutamate transporter activity by changing its chloride dependence. *J Neurosci* 2005; 25: 4672-80.
 45. Holtje M, Winter S, Walther D, *et al.* The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Galphaq in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *J Biol Chem* 2003; 278: 15850-8.
 46. Ahnert-Hilger G, Nurnberg B, Exner T, *et al.* The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *EMBO J* 1998; 17: 406-13.
 47. Brunk I, Blex C, Rachakonda S, *et al.* The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *J Biol Chem* 2006; 281: 33373-85.
 48. Burnstock G, Kennedy C. P2X receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 2011; 61: 333-72.
 49. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, *et al.* International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 281-341.
 50. Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Miras-Portugal MT, *et al.* Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: changes in expression associated with neuronal differentiation. *J Neurochem* 2014; 131: 290-302.
 51. Miras-Portugal MT, Torres M, Rotllan P, *et al.* Adenosine transport in bovine chromaffin cells in culture. *J Biol Chem* 1986; 261: 1712-9.
 52. Gunther Sillero MA, de Diego A, Silles E, *et al.* Synthesis of (di)nucleoside polyphosphates by the ubiquitin activating enzyme E1. *FEBS Lett* 2005; 579: 6223-9.
 53. Sillero MA, Guranowski A, Sillero A. Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase. *Eur J Biochem* 1991; 202: 507-13.
 54. Brevet A, Chen J, Leveque F, *et al.* In vivo synthesis of adenylylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates (Ap4N) by *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8275-9.
 55. Zamecnik PC, Stephenson ML, Janeway CM, *et al.* Enzymatic synthesis of diadenosine tetraphosphate and diadenosine triphosphate with a purified lysyl-sRNA synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 24: 91-7.
 56. Jankowski V, van der Giet M, Mischak H, *et al.* Dinucleoside polyphosphates: strong endogenous agonists of the purinergic system. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 1142-53.
 57. Pintor J, Diaz-Hernandez M, Gualix J, *et al.* Diadenosine polyphosphate receptors. from rat and guinea-pig brain to human nervous system. *Pharmacol Ther* 2000; 87: 103-15.
 58. Pintor J, Rotllan P, Torres M, *et al.* Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem* 1992; 200: 296-300.
 59. Rodriguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, *et al.* Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem* 1988; 51: 1696-703.
 60. Winkler H. The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience* 1976; 1: 65-80.
 61. Pintor J, Torres M, Miras-Portugal MT. Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci* 1991; 48: 2317-24.
 62. Jo YH, Schlichter R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 1999; 2: 241-5.
 63. Sawynok J, Downie JW, Reid AR, *et al.* ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res* 1993; 610: 32-8.
 64. von Kugelgen I, Starke K. Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1991; 344: 419-29.
 65. Richardson PJ, Brown SJ. ATP release from affinity-

- purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 1987; 48: 622-30.
66. Silinsky EM. On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol* 1975; 247: 145-62.
 67. Burnstock G, Krugel U, Abbracchio MP, *et al.* Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol* 2011; 95: 229-74.
 68. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; 87: 659-797.
 69. Pintor J, Kowalewski HJ, Torres M, *et al.* Synaptic Vesicle Storage of Diadenosine Polyphosphates in the Torpedo Electric Organ. *Neuroscience Research Communications* 1992; 10: 9-15.
 70. Pintor J, Diaz-Rey MA, Torres M, *et al.* Presence of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci Lett* 1992; 136: 141-4.
 71. Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993; 265: C577-606.
 72. Hutton JC, Penn EJ, Peshavaria M. Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secretory granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem J* 1983; 210: 297-305.
 73. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med* 1979; 30: 119-34.
 74. Rudnick G. Vesicular ATP transport is a hard (V)NUT to crack. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5949-50.
 75. Winkler H, Schopf JA, Hortnagl H. Bovine adrenal medulla: subcellular distribution of newly synthesised catecholamines, nucleotides and chromogranins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1972; 273: 43-61.
 76. Stevens P, Robinson RL, Van Dyke K, *et al.* Studies on the synthesis and release of adenosine triphosphate-8-³H in the isolated perfused cat adrenal gland. *J Pharmacol Exp Ther* 1972; 181: 463-71.
 77. Stjärne L, Hedqvist R, Lagercrantz H. Catecholamine and adenine nucleotide material in effluent from stimulated adrenal medulla and spleen: a study of the exocytosis hypothesis for hormone secretion and neurotransmitter release. *Biochem Pharmacol* 1970; 19: 1147-58.
 78. Peer LJ, Winkler H, Snider SR, *et al.* Synthesis of nucleotides in adrenal medulla and their uptake into chromaffin granules. *Biochem Pharmacol* 1976; 25: 311-5.
 79. Kostron H, Winkler H, Peer LJ, *et al.* Uptake of adenosine triphosphate by isolated adrenal chromaffin granules: a carrier-mediated transport. *Neuroscience* 1977; 2: 159-66.
 80. Aberer W, Kostron H, Huber E, *et al.* A characterization of the nucleotide uptake of chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem J* 1978; 172: 353-60.
 81. Weber A, Winkler H. Specificity and mechanism of nucleotide uptake by adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 1981; 6: 2269-76.
 82. Taugner G, Heym C, Kummer W, *et al.* Nucleosidetriphosphate-ADP-phosphotransferase: a new enzyme in chromaffin vesicles. *Biog Amines* 1988; 5: 409-42.
 83. Taugner G, Wunderlich I. Phosphoryl group transfer by a fraction of the soluble proteins of catecholamine storage vesicles. *J Neurochem* 1981; 36: 1879-92.
 84. Gualix J, Abal M, Pintor J, *et al.* Presence of epsilon-adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of epsilon-ATP. *FEBS Lett* 1996; 391: 195-8.
 85. Van Dyke K, Robinson R, Urquilla P, *et al.* An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology* 1977; 15: 377-91.
 86. Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT, *et al.* Adenosine 5'-tetraphosphate (Ap(4)), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2381-90.
 87. Gualix J, Alvarez AM, Pintor J, *et al.* Studies of chromaffin granule functioning by flow cytometry: transport of fluorescent epsilon-ATP and granular size increase induced by ATP. *Receptors Channels* 1999; 6: 449-61.
 88. Gualix J, Fideu MD, Pintor J, *et al.* Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *FASEB J* 1997; 11: 981-90.
 89. Gasnier B, Scherman D, Henry JP. Inactivation of the catecholamine transporter during the preparation of chromaffin granule membrane 'ghosts'. *FEBS Lett* 1987; 222: 215-9.
 90. Henry JP, Sagne C, Bedet C, *et al.* The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem Int* 1998; 32: 227-46.
 91. Taugner G, Wunderlich I, John F. Distribution and metabolic fate of adenosine nucleotides in the membrane of storage vesicles from bovine adrenal medulla. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1979; 309: 29-43.
 92. Gruninger HA, Apps DK, Phillips JH. Adenine nucleotide and phosphoenolpyruvate transport by bovine chromaffin granule "ghosts". *Neuroscience* 1983; 9: 917-24.

93. Bankston LA, Guidotti G. Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J Biol Chem* 1996; 271: 17132-8.
94. Zimmermann H. Turnover of adenine nucleotides in cholinergic synaptic vesicles of the Torpedo electric organ. *Neuroscience* 1978; 3: 827-36.
95. Luqmani YA. Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience* 1981; 6: 1011-21.
96. Gualix J, Pintor J, Miras-Portugal MT. Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem* 1999; 73: 1098-104.
97. Roseth S, Fykse EM, Fonnum F. Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J Neurochem* 1995; 65: 96-103.
98. Neet KE, Ainslie GR, Jr. Hysteretic enzymes. *Methods Enzymol* 1980; 64: 192-226.
99. Casillas T, Delicado EG, Garcia-Carmona F, *et al.* Kinetic and allosteric cooperativity in L-adenosine transport in chromaffin cells. A mnemonical transporter. *Biochemistry* 1993; 32: 14203-9.
100. McLennan AG. Dinucleoside polyphosphates-friend or foe? *Pharmacol Ther* 2000; 87: 73-89.
101. Miyaji T, Sawada K, Omote H, *et al.* Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *J Biol Chem* 2011; 286: 42881-7.
102. Gropp T, Brustovetsky N, Klingenberg M, *et al.* Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. *Biophys J* 1999; 77: 714-26.
103. Austin J, Aprille JR. Carboxyatractyloside-insensitive influx and efflux of adenine nucleotides in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1984; 259: 154-60.
104. Montezinho LP, Fonseca CP, Geraldés CF, *et al.* Quantification and localization of intracellular free mg in bovine chromaffin cells. *Met Based Drugs* 2002; 9: 69-80.
105. Gunther T. Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg²⁺. *Magnes Res* 2006; 19: 225-36.
106. Kato Y, Hiasa M, Ichikawa R, *et al.* Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017.
107. Kato Y, Omote H, Miyaji T. Inhibitors of ATP release inhibit vesicular nucleotide transporter. *Biol Pharm Bull* 2013; 36: 1688-91.
108. Martin CA, Krantz DE. *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters. *Neurochem Int* 2014; 73: 71-88.
109. Hobert O. The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 2013: 1-106.
110. Sesma JI, Kreda SM, Okada SF, *et al.* Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: C976-84.
111. Jung SK, Morimoto R, Otsuka M, *et al.* Transmembrane topology of vesicular glutamate transporter 2. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 547-9.
112. Foss SM, Li H, Santos MS, *et al.* Multiple dileucine-like motifs direct VGLUT1 trafficking. *J Neurosci* 2013; 33: 10647-60.
113. Juge N, Yoshida Y, Yatsushiro S, *et al.* Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem* 2006; 281: 39499-506.
114. Almqvist J, Huang Y, Laaksonen A, *et al.* Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters. *Protein Sci* 2007; 16: 1819-29.
115. Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, *et al.* Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *J Biol Chem* 2010; 285: 26107-13.
116. Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, *et al.* Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci Rep* 2014; 4: 6689.
117. Nakagomi H, Yoshiyama M, Mochizuki T, *et al.* Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. *Sci Rep* 2016; 6: 29761.
118. Masuda T, Ozono Y, Mikuriya S, *et al.* Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat Commun* 2016; 7: 12529.
119. Larsson M, Sawada K, Morland C, *et al.* Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb Cortex* 2012; 22: 1203-14.
120. Ho T, Jobling AI, Greferath U, *et al.* Vesicular expression and release of ATP from dopaminergic neurons of the mouse retina and midbrain. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 389.
121. Wise RA. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res* 2008; 14: 169-83.
122. Joshua M, Adler A, Bergman H. The dynamics of dopamine in control of motor behavior. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19: 615-20.
123. Schultz W. Updating dopamine reward signals. *Curr Opin Neurobiol* 2013; 23: 229-38.
124. Cachope R, Cheer JF. Local control of striatal dopamine release. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 188.
125. Benazzouz A, Mamad O, Abedi P, *et al.* Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 87.
126. Díez-Zaera M, Díaz-Hernández JI, Hernández-Alvarez E, *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal

- neurons. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 1014-24.
127. Menendez-Mendez A, Diaz-Hernandez JI, Miras-Portugal MT. The vesicular nucleotide transporter (VNUT) is involved in the extracellular ATP effect on neuronal differentiation. *Purinergic Signal* 2015; 11: 239-49.
 128. Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, *et al.* ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 2003; 40: 971-82.
 129. Newman EA. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 2003; 23: 1659-66.
 130. Stout CE, Costantin JL, Naus CC, *et al.* Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 277: 10482-8.
 131. Parpura V, Zorec R. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 2010; 63: 83-92.
 132. Oya M, Kitaguchi T, Yanagihara Y, *et al.* Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 438: 145-51.
 133. Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, *et al.* Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* 2013; 61: 1320-30.
 134. Ohsawa K, Irino Y, Sanagi T, *et al.* P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* 2010; 58: 790-801.
 135. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, *et al.* UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 2007; 446: 1091-5.
 136. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, *et al.* Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 1975-82.
 137. Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki K, *et al.* Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Sci Rep* 2014; 4: 4329.
 138. Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, *et al.* P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 2008; 28: 4949-56.
 139. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003; 424: 778-83.
 140. Jung J, Uesugi N, Jeong NY, *et al.* Increase of transcription factor EB (TFEB) and lysosomes in rat DRG neurons and their transportation to the central nerve terminal in dorsal horn after nerve injury. *Neuroscience* 2016; 313: 10-22.
 141. Goto T, Oh SB, Takeda M, *et al.* Recent advances in basic research on the trigeminal ganglion. *J Physiol Sci* 2016; 66: 381-6.
 142. Moriyama S, Hiasa M. Expression of Vesicular Nucleotide Transporter in the Mouse Retina. *Biol Pharm Bull* 2016; 39: 564-9.
 143. Perez de Lara MJ, Guzman-Aranguiz A, de la Villa P, *et al.* Increased levels of extracellular ATP in glaucomatous retinas: Possible role of the vesicular nucleotide transporter during the development of the pathology. *Mol Vis* 2015; 21: 1060-70.
 144. Shin YH, Lee SJ, Jung J. Secretion of ATP from Schwann cells through lysosomal exocytosis during Wallerian degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 429: 163-7.
 145. Haanes KA, Novak I. ATP storage and uptake by isolated pancreatic zymogen granules. *Biochem J* 2010; 429: 303-11.
 146. Haanes KA, Kowal JM, Arpino G, *et al.* Role of vesicular nucleotide transporter VNUT (SLC17A9) in release of ATP from AR42J cells and mouse pancreatic acinar cells. *Purinergic Signal* 2014.
 147. Geisler JC, Corbin KL, Li Q, *et al.* Vesicular nucleotide transporter-mediated ATP release regulates insulin secretion. *Endocrinology* 2013; 154: 675-84.
 148. Finger TE, Danilova V, Barrows J, *et al.* ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 2005; 310: 1495-9.
 149. Taruno A, Vingtdoux V, Ohmoto M, *et al.* CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 2013; 495: 223-6.
 150. Iwatsuki K, Ichikawa R, Hiasa M, *et al.* Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 1-5.
 151. Ichikawa R, Nakamura E, Nomura M, *et al.* The role of VNUT gene on the taste responses. *The Journal of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell* 2013; 20: 271-4.
 152. Burnstock G. Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signal* 2014; 10: 103-55.



Stem cells and their exosomes as an advanced therapy to treat incisional hernia: proof of concept in a murine model

Title in Spanish: *Células madre y sus exosomas como terapia avanzada para tratar la hernia incisional: prueba de concepto en modelo murino*

Rebeca Blázquez^{1,2}, Francisco Miguel Sánchez-Margallo^{1,2}, Verónica Álvarez¹, Alejandra Usón¹, Federica Marinaro¹, Javier G. Casado^{1,2,*}

¹Unidad de Terapia Celular, Centro de Cirugía de Mínima Invasión 'Jesús Usón', Cáceres, España. ²CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Madrid, España.

ABSTRACT: An incisional hernia constitutes a tissue protrusion through a traumatic or surgical scar in the abdominal wall. Frequently, the treatment of the incisional hernia, as well as other types of hernia, involves the implantation of a surgical mesh to reinforce the weakened tissue. However, an exacerbated inflammatory response is commonly developed after this implantation, having serious consequences for the patient. Considering the immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells (MSCs) and their exosomes (exo-MSCs), in this study we proposed that the administration of these two therapeutic products, together with fibrin sealants that are frequently used to fix surgical meshes, could have a beneficial biological and therapeutic effect that could help to modulate the inflammatory response and improve the success of the surgical mesh implantation. The results obtained in this work showed, in a murine model of incisional hernia, that exo-MSCs reduce M1 inflammatory macrophages infiltration and that there is a predominance of Th2-related cytokines in the surrounding tissue of MSCs or exo-MSCs treated meshes, favoring the macrophage polarization towards a M2 anti-inflammatory phenotype. This study concludes that mesh fixation with fibrin sealants co-administered with MSCs or exo-MSCs would have a beneficiary effect on the treatment of incisional hernia in terms of reduction of the inflammatory response and modulation of the foreign body reaction.

RESUMEN: Una hernia incisional consiste en una protrusión de tejido a través de una cicatriz traumática o quirúrgica en la pared abdominal. El tratamiento de este y de otros tipos de hernias pasa frecuentemente por la implantación de una malla quirúrgica para reforzar el tejido debilitado. Sin embargo, a menudo se produce una respuesta inflamatoria exacerbada que desemboca en diferentes complicaciones, teniendo consecuencias graves para el paciente. Considerando el potencial inmunomodulador de las células madre mesenquimales (MSCs) y de sus exosomas (exo-MSCs), en este estudio planteamos que la administración de ambos productos terapéuticos, conjuntamente con los selladores de fibrina que se utilizan frecuentemente para la fijación de las mallas quirúrgicas, podría ejercer un efecto biológico y terapéutico que ayudara a controlar esa respuesta inflamatoria y mejorarla, por tanto, el éxito del tratamiento con mallas quirúrgicas. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron, en un modelo murino de hernia incisional, que los exo-MSCs reducen la infiltración de macrófagos inflamatorios M1 y que existe una predominancia de citoquinas relacionadas con la respuesta Th2, y con ello, con la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio, en el tejido circundante a las mallas en las que se vehicularon MSCs o sus exosomas. Este estudio concluye que la fijación de mallas quirúrgicas con selladores de fibrina combinados con MSCs o exo-MSCs tendría un efecto beneficioso en el tratamiento de la hernia incisional, en términos de reducción de la respuesta inflamatoria y modulación de una reacción exacerbada frente a un cuerpo extraño.

*Corresponding Author: jgarcia@ccmijesususon.com

Received: March 19, 2018 Accepted: March 20, 2018

Premio Real Academia Nacional de Farmacia en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 1 (2018), pp. 39-51

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Una hernia incisional se define como una protrusión de tejido, generalmente peritoneo, a través de una cicatriz traumática o quirúrgica en la pared abdominal, y que puede contener o no una víscera abdominal y/u otros tejidos (1). La hernia incisional se presenta de manera frecuente como una complicación de la cirugía abdominal, constituyendo una importante fuente de morbilidad (2). Para su tratamiento, se utilizan a menudo mallas quirúrgicas, las cuales resultan también efectivas para la reparación de prolapsos de órganos, el tratamiento de la incontinencia urinaria por esfuerzo y el cierre de grandes heridas. La gran mayoría de estas prótesis está constituida por materiales sintéticos como polipropileno, poliéster o politetrafluoretileno (PTFE), que pueden encontrarse o no en combinación con otros materiales como titanio, ácidos grasos omega-3 o hialuronato (3).

La fijación de estas mallas a los tejidos puede realizarse mediante sutura, grapas, “*tacks*” (4) o pegamentos quirúrgicos tipo cianocrilato (5). Los selladores de fibrina comenzaron a usarse en 1909 y, en las dos últimas décadas, ha sido ampliamente descrito su uso para la fijación de mallas quirúrgicas, demostrándose que este procedimiento no incrementa los riesgos asociados a la hernia inguinal. De hecho, disminuye el riesgo en comparación con métodos de fijación que penetran en el tejido. Además, se ha evidenciado una disminución tanto de la morbilidad posoperatoria como de la duración de la estancia hospitalaria (6). Otros estudios en los que se utilizaron selladores de fibrina para la fijación de mallas mostraron disminución del dolor crónico en comparación con la fijación mediante suturas, así como menores tiempos quirúrgicos (7). En cuanto a la comparación con los “*tacks*” quirúrgicos, la mayoría de los estudios publicados sugieren también una disminución del dolor (8). Por último, se ha demostrado una buena neovascularización e integración en el tejido en modelo de hernia incisional de rata usando selladores de fibrina, en comparación con grapas quirúrgicas (9).

Además de las propiedades adhesivas de los selladores de fibrina, el papel biológico de los coágulos de fibrina se ha estudiado desde diferentes perspectivas. En modelos *in vivo* de anastomosis en colon se demostró la presencia de neutrófilos infiltrados en los selladores de fibrina (10) y en experimentos *in vitro* se ha evidenciado que la composición de estos coágulos de fibrina tienen un efecto significativo en la migración de neutrófilos y que influyen en el proceso de cicatrización (11).

En los últimos años, los selladores de fibrina se han utilizado con éxito en combinación con células para aplicaciones relacionadas con la ingeniería tisular (12). Así, se ha descrito su uso como vehículo de fibroblastos dérmicos en el tratamiento de heridas crónicas (13) y como soporte para la implantación de diferentes tipos de células madre (14–18) en distintos ámbitos como la neuroprotección (14), regeneración nerviosa (15), reparación ósea (16), reparación osteocondral (17), cicatrización (18) o reparación del miocardio tras un

infarto (19).

Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró, utilizando un modelo murino, que las mallas quirúrgicas recubiertas de células madre mesenquimales (MSC, *mesenchymal stem cells*) inducen un ambiente antiinflamatorio que reduce los procesos inflamatorios exacerbados comúnmente observados tras la implantación de estas mallas (20). Basándonos en este primer trabajo, y teniendo en cuenta el papel de los selladores de fibrina como vehículo para la administración de células madre, en el presente estudio quisimos evaluar el efecto biológico y terapéutico de las MSCs vehiculadas en selladores de fibrina y en el contexto de la hernia incisional. Además, dado que el efecto terapéutico de las MSCs está mediado en gran medida por un efecto paracrino, hemos incluido los exosomas derivados de estas células, propuestos como principales responsables de este efecto (21), como producto terapéutico en este estudio. Así, planteamos además una terapia libre de células, que ofrece múltiples ventajas frente a las terapias celulares, relacionadas principalmente con la estandarización del producto terapéutico.

En este estudio se han evaluado diferentes parámetros: histología, infiltración leucocitaria, y análisis de expresión génica en el lugar de implantación de las mallas de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y la remodelación tisular. En resumen, en este trabajo mostramos que la fijación de mallas quirúrgicas con selladores de fibrina combinados con MSCs o sus exosomas podría tener un efecto beneficioso para el tratamiento de las hernias incisionales en términos de reducción de la respuesta inflamatoria y control de la reacción a cuerpo extraño.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento y expansión de las células madre mesenquimales murinas

Las MSCs murinas se aislaron a partir de la médula ósea de fémures de tres ratones eutanasiados de entre 2 y 6 meses de edad. La suspensión celular obtenida se pasó por filtros de 40 μm y las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Tras lavarse dos veces con tampón fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Solution*), las células se resuspendieron en DMEM con un 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*), y se sembraron en frascos de cultivo, manteniéndose a 37°C y 5% CO₂. Tras 48 horas en cultivo, las células no adherentes se eliminaron, mientras que las células que permanecieron adheridas se cultivaron en un 80-90% de confluencia, momento en el que se despegaron con una solución al 0.25% de tripsina (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA) para así sembrarlas en un nuevo frasco a una densidad de 5 000 – 6 000 células/cm². El medio de cultivo se cambió cada 3-4 días. Se utilizaron células en pases 10-15 para los experimentos *in vivo*.

2.2. Análisis fenotípico de las células madre mesenquimales murinas

El análisis fenotípico de las MSCs murinas se realizó mediante citometría de flujo. Para ello, 2×10^5 células se marcaron con anticuerpos monoclonales frente a CD29, CD44, CD90, CD105, MHC clase I y MHC clase II, y se incubaron durante 30 min a 4°C con la concentración apropiada de anticuerpo en presencia de PBS con 2% de FBS. Las células se lavaron y se resuspendieron en PBS. El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, CA, USA) tras la adquisición de 10^5 eventos.

Las células viables se seleccionaron de acuerdo a sus características de tamaño y granularidad (FSC/SSC) y se analizaron con el *software* CellQuest (BD Biosciences, CA, USA). El nivel de expresión de cada marcador se expresó como la intensidad de fluorescencia relativa media (MRFI, *Mean Relative Fluorescence Intensity*), que se calculó dividiendo la intensidad de fluorescencia media (MFI, *Mean Fluorescence Intensity*) por la MFI de su control negativo. Los valores de MRFI menores de 2 se consideraron negativos (-), los valores positivos fueron aquellos comprendidos entre 2 y 10 (+), y los fuertemente positivos, aquellos cuyo valor estaba entre 10 y 100 (++)

2.3. Potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales murinas

Los ensayos de diferenciación se llevaron a cabo cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia. Se utilizaron protocolos estándar para promover la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica de las células. Para ello, las células se cultivaron durante 21 días con medios específicos de diferenciación (Gibco Life Sciences, Rockville, MD, USA), que eran reemplazados cada tres días. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron y se tiñeron con Oil Red O, Alcian Blue y Alizarin Red S para evidenciar la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica respectivamente. Las células diferenciadas se observaron mediante microscopía óptica.

2.4. Aislamiento y purificación de los exosomas derivados de células madre mesenquimales

Los exosomas derivados de células madre mesenquimales (exo-MSCs) se obtuvieron a partir de MSCs murinas de médula ósea cultivadas en frascos de 175 cm². Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, el medio de cultivo (DMEM con 10% FBS) se reemplazó por medio de aislamiento de exosomas (DMEM con 1% de insulina-transferrina-selenio). Los sobrenadantes se recogieron cada 3-4 días. Para eliminar las células muertas y los detritus celulares, los sobrenadantes se centrifugaron a 1 000 x g durante 10 min y a 5 000 x g durante 20 min a 4°C, y se pasaron a través de un filtro de 0.22 µm. Aproximadamente 15 ml de estos sobrenadantes se ultrafiltraron mediante concentradores Amicon® Ultra de 3 kDa de límite de peso molecular (Merck-Millipore, MA, USA), centrifugándolos durante 60 min a 4 000 x g y obteniendo 200-300 µl de sobrenadantes concentrados que se almacenaron a -20°C.

2.5. Caracterización de los exosomas derivados de células madre mesenquimales

Antes de realizar los ensayos *in vivo*, los sobrenadantes concentrados se caracterizaron mediante cuantificación de proteína total, citometría de flujo y análisis de rastreo de nanopartículas.

La concentración de exosomas se determinó, en primer lugar, de manera indirecta mediante cuantificación de proteína total a través de un ensayo Bradford. Para cuantificar la concentración de proteína, 20 µl de la muestra de exosomas se incubaron con 180 µl de reactivo Bradford (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a temperatura ambiente. Tras 5 min, se determinó la absorbancia a 595 nm, y la concentración de proteína de las muestras se extrapoló a partir de una curva de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina.

Para el análisis mediante citometría de flujo, los exosomas se conjugaron con microesferas de 4 µm de látex (Aldehyde/Sulfate latex beads, Molecular probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, 5 µg de exosomas se incubaron durante toda la noche a 4°C con 10 µl de microesferas, se añadieron 110 µl de glicina 1M y, tras 30 min de incubación, las muestras se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en un volumen final de 0.5 ml de PBS con 0.5% BSA. Estas microesferas recubiertas de exosomas se incubaron durante 30 min a 4°C con anticuerpos monoclonales murinos anti-CD9 (BD Biosciences, San José, CA, USA). Tras esta incubación, las muestras se lavaron y resuspendieron en PBS con 0.5% BSA. El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, San José, CA, USA).

Finalmente, la concentración y el tamaño de las partículas de los concentrados se midieron mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NanoSight Ltd, Amesbury, Reino Unido), que relaciona la tasa de movimiento browniano con el tamaño de la partícula. Los resultados se analizaron con la versión 2.2 del *software* de análisis de rastreo de nanopartículas.

2.6. Preparación del sellador de fibrina y combinación con las células madre mesenquimales y sus exosomas

El sellador de fibrina se preparó a partir de trombina (500 IU/ml) y fibrinógeno (80 mg/ml). Estos componentes se mezclaron a un ratio 1:1 utilizando un aplicador de doble jeringa. Cada malla se fijó con un volumen total de 400 µl del sellador.

Para la combinación con MSCs, las células se despegaron de los frascos de cultivo con una solución de tripsina al 0.25%, se contaron y se ajustaron a una concentración de 4×10^6 células/ml. Un total de 1.6×10^6 células en 400 µl de DMEM se mezclaron con trombina (500 IU/ml) a un ratio 1:1. La suspensión células se mezcló a continuación con fibrinógeno (80 mg/ml) a un ratio 1:1 utilizando un aplicador de doble jeringa que permitió la mezcla de ambos componentes. Para la fijación de las mallas se usó un volumen de 400 µl de la solución final (4×10^5 células).

La viabilidad de las MSCs en el sellador de fibrina se midió en términos de actividad metabólica a través de un ensayo CCK-8 siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma, St. Louis, MO, USA). Brevemente, las MSCs se combinaron con el sellador de fibrina y se mantuvieron en cultivo durante dos días en DMEM. Como control negativo, se utilizaron MSCs en condiciones de cultivo estándar. Además, la morfología celular de las MSCs en combinación con el sellador de fibrina se examinó mediante microscopía óptica.

Para la combinación del sellador de fibrina con exo-MSCs, los concentrados de exosomas se descongelaron lentamente antes de combinarse con la solución de fibrina. Un total de 200 μ l de exosomas (medidos en proteína total) a 20 000 μ g/ml se mezclaron con trombina (500 IU/ml) a un ratio 1:1 y esta solución se mezcló con fibrinógeno (80 mg/ml) a un ratio 1:1. Por último, ambas diluciones se mezclaron usando un aplicador de doble jeringa. Para la fijación de cada malla se usó un volumen de 400 μ l de la solución final (4 000 μ g de proteínas exosomales).

2.7. Modelo de hernia incisional y procedimientos quirúrgicos

Los cuidados de los animales y todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal del Centro de Cirugía de Mínima Invasión, y se desarrollaron de acuerdo a las recomendaciones del gobierno local. Para la realización de este estudio se utilizó un total de 16 ratones ICR con edad de 3-5 meses y de 35-40 g de peso. Los animales se dividieron en cuatro grupos: en el primer grupo (n=4), las mallas quirúrgicas se fijaron con puntos simples (SUT); en el segundo grupo (n=4), se fijaron con sellador de fibrina (SF); en el tercer grupo (n=4), las mallas se fijaron con el sellador de fibrina en combinación con MSCs (SF+MSCs), y en el cuarto grupo (n=4), con el sellador de fibrina en combinación con los exo-MSCs (SF+exos).

El modelo murino de hernia incisional se desarrolló a partir de un modelo animal previamente descrito (22). Los animales se premedicaron con 2 mg/kg de meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemania) y 0.06 mg/kg de buprenorfina (Buprex®, Schering-Plough, NJ, USA) por vía intraperitoneal y los procedimientos se desarrollaron bajo anestesia inhalatoria inducida en una cámara con isoflurano al 3% y mantenida con isoflurano al 1.5-2.0% a través de una máscara inhalatoria. El flujo de oxígeno se mantuvo a 0.5-1.0 l/min durante todo el procedimiento.

Una vez anestesiados, el abdomen fue rasurado y lavado con una solución yodada. Se realizó una incisión de 0.7-0.8 cm de longitud en cada uno de los lados del abdomen, y se retiró un fragmento compuesto por tejido muscular y aponeurosis de 0.6 cm de diámetro bajo cada una de las incisiones. A continuación, se implantaron mallas de polipropileno (Assumesh, Assut Europe, Roma, Italia) de 1cm² en el espacio preperitoneal sobre cada uno

de los defectos creados. Estas mallas se fijaron según lo indicado anteriormente para cada grupo. Por último, las incisiones cutáneas se cerraron con 4-5 puntos simples de sutura absorbible monofilamento de polidioxanona (PDSII™, Ethicon, Johnson & Johnson, NJ, USA).

Durante los tres primeros días tras la cirugía, los animales recibieron 10 mg/ml de paracetamol (Apiretal®, ERN, Barcelona, España) en el agua de bebida y 0.1 mg/kg de buprenorfina inyectada vía subcutánea cada 12 horas. Siete días tras la cirugía, los animales fueron eutanasiados en una cámara de CO₂.

2.8. Determinaciones histológicas

Tras la eutanasia de los animales, se retiraron las mallas implantadas y se realizaron los diferentes análisis *post mortem*. Para el estudio histológico, una de las dos mallas implantadas en cada animal, junto con la piel y la capa muscular-aponeurótica, se fijó en paraformaldehído al 4%, se embebieron en parafina y se cortaron en láminas de 5-8 μ m de espesor. Para la visualización de las muestras, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

2.9. Estudio fenotípico del infiltrado leucocitario

La malla restante en cada animal se dividió en dos, y para el estudio fenotípico del infiltrado de leucocitos, una de estas dos partes se sumergió en PBS y las células adheridas se despegaron mediante una solución de tripsina al 0.25%. Las células recuperadas se incubaron durante 30 min a 4°C con la concentración apropiada de anticuerpos monoclonales murinos en PBS con 2% de FBS. Las células se marcaron con anti-CD45 murino conjugado con PerCP (Miltenyi Biotec), anti-B220 murino conjugado con PE (Miltenyi Biotec) y anti-Ly6C murino conjugado con FITC (Miltenyi Biotec). A continuación, se lavaron y se resuspendieron en PBS. El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, CA, USA) tras la adquisición de 10⁵ eventos.

Se determinó el porcentaje de células leucocitarias (CD45⁺) del total de células infiltradas y, dentro de ellas, la expresión de Ly6C sirvió para diferenciar las subpoblaciones de macrófagos M1 (alta expresión de Ly6C) y M2 (baja expresión de Ly6C). Asimismo, se determinó la subpoblación de linfocitos B activados, correspondiente a las células B220⁺/Ly6C⁺, dentro de la población de células leucocitarias.

2.10. Análisis de expresión génica

La mitad restante de la segunda malla implantada en cada animal se utilizó para el análisis de expresión génica. Para ello, se aisló el ARN total de las células adheridas a la malla mediante TRI-Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir del ARNm mediante una reacción de transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Para la amplificación por PCR se utilizaron *kits* comerciales de expresión génica, todos ellos de Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc. Los genes

analizados fueron IL-4 (ID: 16189), IL-13 (ID: 16163), Arg-1 (ID: 11846), iNOS (ID: 18126), MCP1 (ID: 20296), MIP-1 α (ID: 20302), Opn (ID: 20750), Wt1 (ID: 22431), Efemp1 (ID: 216616), Col1a1 (ID: 12842) y Col3a1 (ID: 12825).

La qRT-PCR se llevó a cabo utilizando sondas TaqMan en el equipo 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.). Los productos de PCR se cuantificaron mediante el cálculo de 2^{- Δ Ct}. Todas las muestras (n=4 por grupo) se analizaron separadamente utilizando el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, ID: 14433) como *housekeeping*.

2.11. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el *software* SPSS-21 (SPSS, Chicago, IL, USA) mediante ANOVA de un factor seguido del test de Tukey cuando se encontraron diferencias significativas, en el caso de variables

paramétricas. Para variables no paramétricas, se llevó a cabo el test de Kruskal-Wallis, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn cuando se encontraron diferencias significativas entre grupos. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (SD, *standard deviation*). Todos los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Fenotipo y capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales murinas

El análisis mediante citometría de flujo de los diferentes marcadores de superficie de las MSCs murinas derivadas de médula ósea mostraron un perfil fenotípico CD29⁺/CD44⁺/CD90⁺/CD105⁺/MHC-I⁺/MHC-II⁻ (Tabla 1). Además, el ensayo de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica permitió demostrar la multipotencialidad de las células (Figura 1).

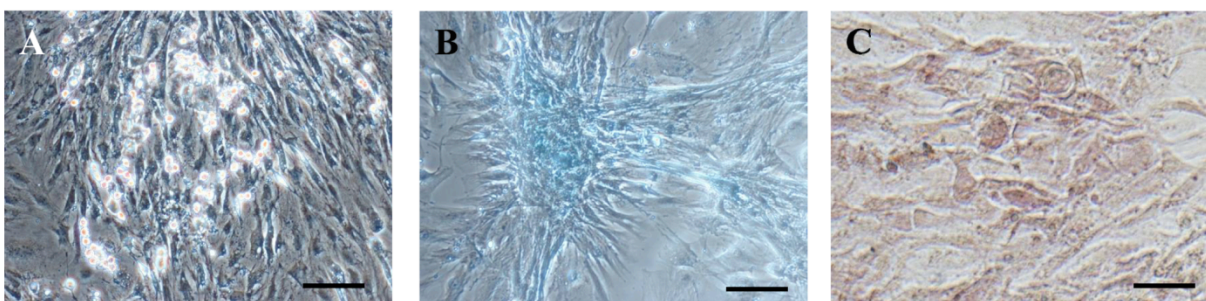


Figura 1. Multipotencialidad de las MSCs murinas derivadas de médula ósea. Diferenciación adipogénica (A), condrogénica (B) y osteogénica (C) de las MSCs murinas cultivadas durante 21 días con medios específicos de diferenciación. Las diferenciaciones adipogénica, condrogénica y osteogénica se evidenciaron mediante tinción con Oil Red O, Alcian Blue y Alizarin Red S, respectivamente, y visualización mediante microscopía óptica. Escala: 100 μ m.

Tabla 1. Perfil de expresión de los diferentes marcadores de superficie analizados mediante citometría de flujo en las MSCs murinas.

Marcador	CD29	CD44	CD90	CD105	MHC-I	MHC-II
MRFI*	++	++	++	+	++	-

*MRFI ≤ 2 (-), 2 - 10 (+), 10 - 100 (++)

3.2. Caracterización del concentrado de exomas aislado a partir de las células madre mesenquimales murinas

Los sobrenadantes del cultivo de las MSCs, enriquecidos hasta 50 veces, se caracterizaron mediante cuantificación de proteína total, análisis de rastreo de nanopartículas y citometría de flujo.

La determinación de proteína total en estos concentrados mediante ensayo de Bradford resultó en valores de 20 000 μ g/ml. En cuanto al análisis mediante

citometría de flujo, se encontró una expresión positiva del marcador exosomal CD9 (MRFI=4.63). Finalmente, en el análisis de rastreo de nanopartículas se obtuvo un tamaño medio de las partículas de 131.6 \pm 52.2 nm. En cuanto a su concentración, esta fue de 3.96 $\times 10^{11}$ \pm 1.02 $\times 10^{10}$ partículas/ml. La representación detallada del tamaño de partículas frente a su concentración se muestra en la Figura 2.

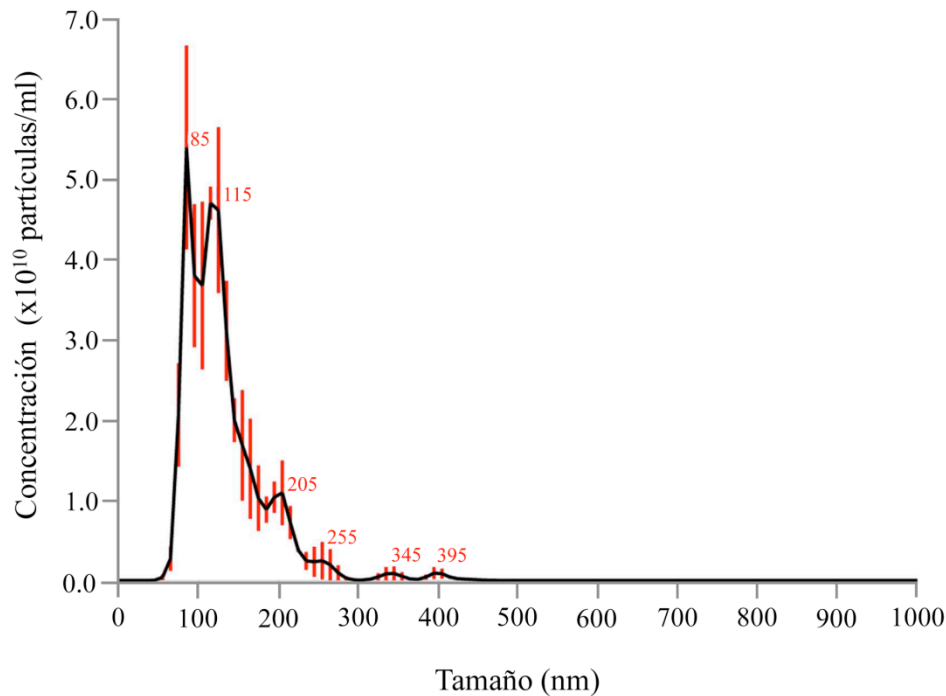


Figura 2. Representación gráfica de la distribución del tamaño y la concentración de las partículas presentes en el concentrado de exosomas, obtenida mediante análisis de rastreo de nanopartículas.

3.3. Evaluación histológica del infiltrado celular en el tejido adyacente al lugar de implantación de las mallas

Los cortes histológicos realizados tras extraer una de las mallas implantadas junto con el tejido adyacente a la misma se evaluaron tras realizar las tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson mediante observación bajo microscopía óptica.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento de la infiltración linfocitaria en el grupo SF. Sin embargo, no

se evidenciaron diferencias cuando se comparó este grupo con los grupos SF+MSCs ni SF+exos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos en términos de hemorragia, necrosis o neovascularización. La tinción con tricrómico de Masson reveló la ausencia de cambios significativos en los depósitos de colágeno alrededor de las mallas implantadas. La Figura 3 muestra campos representativos de las muestras histológicas analizadas.

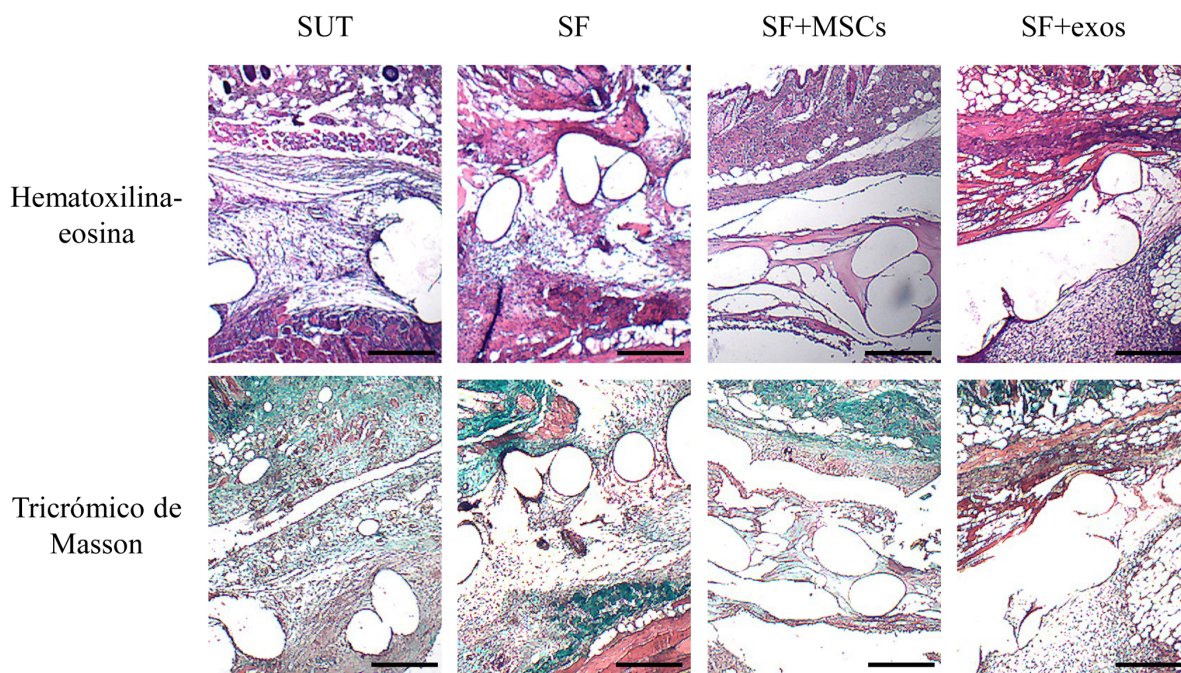


Figura 3. Histología de la zona de implantación de las mallas y el tejido adyacente. Tras la eutanasia de los animales 7 días después de la implantación de las mallas, una de ellas fue extraída junto con la piel y la capa muscular y peritoneo adyacentes, fijada en paraformaldehído al 4%, embebida en parafina y cortada en láminas de 5-8 μm de espesor. Las preparaciones histológicas se tiñeron con hematoxilina-eosina y con tricrómico de Masson. Las imágenes muestran campos representativos de las muestras evaluadas. Escala: 100 μm .

3.4. Evaluación del fenotipo de los linfocitos infiltrados en el lugar de implantación de las mallas quirúrgicas

Para obtener datos adicionales sobre la naturaleza celular de los infiltrados localizados en el tejido adyacente al lugar de implantación de las mallas quirúrgicas, y con el fin de lograr una evaluación más objetiva de estos parámetros que la realizada mediante evaluación histológica, se llevó a cabo la identificación y caracterización de diferentes poblaciones celulares en estos infiltrados mediante citometría de flujo. Para ello, el infiltrado celular se separó mecánicamente de la malla, a la que se encontraba adherido, y se tripsinizó. La suspensión celular se marcó con anticuerpos anti-CD45, anti-Ly6C y anti-B220. Se cuantificó el porcentaje de células leucocitarias (CD45^+), macrófagos M1 ($\text{CD45}^+/\text{Ly6C}$ alto) macrófagos M2 ($\text{CD45}^+/\text{Ly6C}$ bajo) y linfocitos B activados ($\text{CD45}^+/\text{B220}^+/\text{Ly6C}^+$). Una vez terminado el análisis, se realizó la comparación estadística entre grupos.

Los resultados mostraron que el porcentaje de células leucocitarias (células CD45^+ del total de células que conformaban el infiltrado) se incrementó

significativamente en los grupos SF, SF+MSCs y SF+exos en comparación con el grupo SUT (Figura 4A).

El balance entre las subpoblaciones de macrófagos M1 y M2 se analizó, en primer lugar, seleccionando las células conforme a sus características de tamaño y granularidad (FSC/SSC) y a la expresión de CD45. Dentro de esta población, la expresión de Ly6C se utilizó para identificar los dos fenotipos de macrófagos. El análisis estadístico reveló una disminución significativa en el porcentaje de macrófagos M1, predominantemente inflamatorios, en el grupo SF+exos en comparación con el grupo SF. Del mismo modo, en el grupo con exosomas se apreció conjuntamente un aumento significativo en el porcentaje de macrófagos M2, de características antiinflamatorias, al compararlo con el grupo SF (Figura 4B).

De modo similar a los macrófagos M2, la población de linfocitos B activados, identificadas como células $\text{B220}^+/\text{Ly6C}^+$ dentro de la población de células CD45^+ , disminuyó significativamente en el grupo SF+exos en comparación con el grupo SF (Figura 4C).

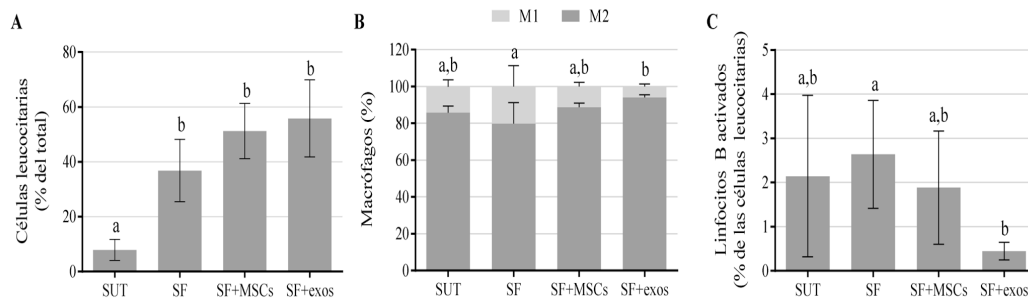


Figura 4. Determinación mediante citometría de flujo de diferentes poblaciones celulares infiltradas en el tejido. Se identificó y caracterizó el porcentaje de células leucocitarias infiltradas en el tejido alrededor de la malla implantada (A), el porcentaje de macrófagos M1/M2 (B) y el porcentaje de linfocitos B activados (C). Las gráficas representan la media±SD de 4 experimentos independientes. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor seguido del test de Tukey para variables con distribución paramétrica (porcentaje de células leucocitarias). Para variables no paramétricas (macrófagos M1 y M2, y porcentaje de linfocitos B activados), se llevó a cabo un test de Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn para evidenciar las diferencias entre grupos concretos. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

3.5. Análisis de expresión génica en el lugar de implantación de las mallas quirúrgicas y en el tejido adyacente

Las mallas quirúrgicas extraídas tras 7 días desde su implantación fueron procesadas para extraer el ARN total y la expresión génica se analizó mediante qRT-PCR. Se analizó una amplia variedad de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (IL-4, IL-13, Arg-1, iNOS, MCP1, MIP-1 α y Opn) así como de genes relacionados con la remodelación tisular (Wt1, Efemp1, Colla1 y Col3a1).

En cuanto al primer grupo de genes analizados, los relacionados con la respuesta inflamatoria, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en la expresión de los genes MCP1 y MIP-1 α . Sin embargo, se observó un aumento significativo en la expresión de IL-4, IL-13, Arg-1 e iNOS en el grupo SF+MSCs en comparación el grupo SF. Además, este aumento resultó

también significativo al compararlo con el grupo SF+exos en el caso de la IL-4 e iNOS. Para IL-13, Arg-1 e iNOS, el aumento de expresión en el grupo SF+MSCs fue también estadísticamente significativo al compararlo con el grupo SUT. En el caso de la Opn, se observó una disminución significativa en los grupos SF, SF+MSCs y SF+exos en comparación con el grupo SUT (Figura 5A).

En relación al grupo de genes implicados en la remodelación tisular, se observó una disminución significativa en la expresión de Efemp1, Colla1 y Colla3 en los grupos SF, SF+MSCs y SF+exos al compararlos con el grupo SUT. El ratio entre la expresión de Colla1 y Colla3 disminuyó significativamente en el grupo SF+MSCs en comparación con el grupo SF. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de Wt1 (Figura 5B).

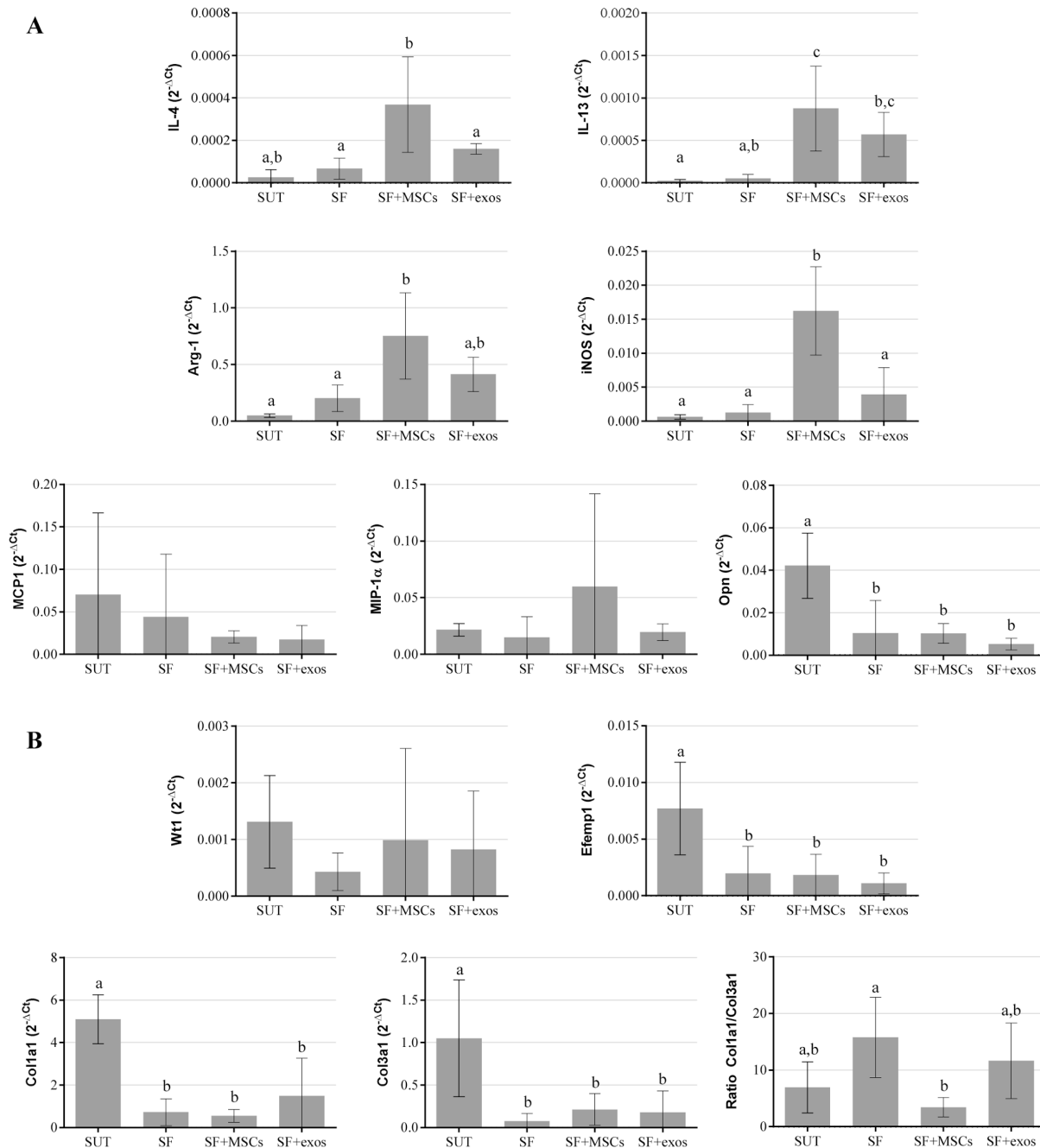


Figura 5. Expresión génica en el lugar de implantación de las mallas y en el tejido adyacente de los diferentes genes analizados. Después de 7 días desde la implantación de las mallas, se aisló el ARN total del tejido adherido a las mallas implantadas, se retrotranscribió el ARNm y el ADNc se amplificó mediante qRT-PCR. Los productos de PCR se cuantificaron mediante el cálculo de $2^{-\Delta Ct}$ utilizando GAPDH como housekeeping. Las gráficas representan la media \pm SD de 4 experimentos independientes. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

4. DISCUSIÓN

El uso de las mallas quirúrgicas sintéticas se introdujo en el tratamiento de las hernias hace aproximadamente cinco décadas. La implantación de estas mallas proporciona un soporte adicional que refuerza los tejidos debilitados o dañados en los diferentes tipos de hernias. En

el caso de las hernias incisionales, así como en otros tipos de hernias, tras la implantación de estas mallas se producen, de manera relativamente frecuente, diferentes efectos adversos que provocan dolor e incomodidad en el paciente. Por ello, se ha trabajado en el desarrollo de nuevos materiales y diseños para la fabricación de las

mallas que permitan reducir la reacción inflamatoria adversa, el dolor crónico o la erosión (23). En los últimos años, los avances en la fabricación de las mallas se han centrado en la biocompatibilidad de los materiales y en mejorar los mecanismos que permiten el remodelado tisular y la trans migración de células del hospedador (24). Además, se han probado clínicamente diferentes recubrimientos de las mallas de polipropileno para reducir la reacción a cuerpo extraño e incrementar la biocompatibilidad (25,26). Recientemente, la combinación de mallas quirúrgicas con células madre adultas ha sido probada por este grupo en condiciones preclínicas, demostrando un efecto antiinflamatorio mediado a través de la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 prorrregenerativo (20). También se han reportado otros estudios en los que se han utilizado MSCs en combinación con mallas quirúrgicas para la reparación de tendón (27) y, en el contexto de las hernias, se han utilizado MSCs autólogas vehiculadas en soportes descelularizados en modelo de hernia inguinal en conejo (28).

Por otra parte, los métodos de fijación de las mallas quirúrgicas son también un asunto de debate. Actualmente, entre los métodos más usados se encuentran la sutura, las grapas, los “*tacks*”, los pegamentos quirúrgicos, o la combinación de varios de ellos, y se han llevado a cabo diferentes estudios para comparar algunos de estos métodos entre sí (29,30).

En este trabajo quisimos evaluar el papel del sellador de fibrina como método de fijación de las mallas y, además, como vehículo para la administración de células madre adultas y sus exosomas en el contexto de las hernias incisionales. Estos selladores de fibrina se han utilizado anteriormente como soporte para la implantación de células madre en múltiples escenarios relacionados con la ingeniería tisular (12) y más específicamente, en la reparación osteocondral (31) y el infarto de miocardio (19).

Nuestros primeros ensayos *in vitro* sirvieron para expandir y caracterizar las MSCs murinas derivadas de médula ósea, demostrando la expresión de marcadores característicos de estas líneas, así como su capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes. Además, los ensayos preliminares realizados para optimizar la combinación de las células con el sellador de fibrina revelaron que la composición de este último debe ser testada cuidadosamente de forma previa a su uso como vehículo de células madre. En nuestro caso, fue necesario ajustar el pH del fibrinógeno y la trombina entre 6.5 y 7.5 para mantener la viabilidad celular (datos no mostrados). Estos resultados son similares a los obtenidos por Ho *et al.*, quienes observaron que las soluciones de trombina y fibrinógeno pueden alterar la tasa de proliferación de MSCs humanas (32).

Los siguientes experimentos se centraron en aislar y caracterizar la fracción enriquecida de exosomas derivados de las MSCs murinas de médula ósea. La concentración, tamaño y expresión del marcador de exosomas CD9 se determinaron mediante análisis seguimiento de

nanopartículas y citometría de flujo, demostrando que el protocolo de aislamiento permite la obtención de estas microvesículas de manera simple y reproducible para ser usadas como producto terapéutico. De hecho, la caracterización de nuestros exosomas arrojó resultados similares a los reportados en publicaciones previas, obtenidos a partir de MSCs humanas y porcinas (33,34).

Los ensayos *in vivo* se realizaron en un modelo murino de hernia incisional utilizando instrumental microquirúrgico. Aunque el modelo de hernia incisional ha sido previamente descrito en cerdo, conejo y rata, el modelo murino ofrece diferentes ventajas con respecto a los primeros, especialmente en términos de disponibilidad de reactivos y consumibles de laboratorio para los análisis posteriores. Para estudiar la respuesta inflamatoria producida a nivel local e identificar las poblaciones celulares infiltradas, se llevó a cabo una evaluación histológica de los tejidos adyacentes al lugar de implantación de las mallas, así como un análisis más preciso de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Por último, se analizó la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta inflamatoria, la polarización de macrófagos y el remodelado tisular en esa misma zona.

El análisis anatomopatológico de las mallas quirúrgicas y su tejido adyacente tras 7 días desde su implantación reveló una infiltración de células leucocitarias en dicha zona cuando se utilizó el sellador de fibrina, independientemente de su combinación con MSCs o sus exosomas. Otros estudios previos han mostrado también un incremento de la infiltración de leucocitos en las redes de fibrina (35) sujetas a una regulación por factores quimiotácticos como los fibrinopéptidos, fibronectina o trombina enzimáticamente activa (36). También en un estudio en el que se analizaban selladores de fibrina como método de fijación de mallas quirúrgicas se reportó que dicha sustancia desencadenó una fuerte respuesta inflamatoria junto con una reacción fibrosa (37). En este punto, es importante tener en cuenta que la reacción inflamatoria observada en nuestro estudio podría tener también un componente relacionado con una posible reacción alérgica contra la fibrina y fibrinógeno humanos en el modelo animal, que ha sido también descrita en un estudio previo (38) en el que, además, se puntualizaba que la respuesta inflamatoria puede resultar beneficiosa desde el punto de vista de la implantación de las mallas, ya que favorecería la incorporación de tejido. De hecho, el refuerzo proporcionado por estos materiales no se produce por la propia malla en sí, sino por la producción de tejido alrededor de sus fibras (39).

Tras la evaluación histológica de los tejidos, el análisis mediante citometría de flujo del infiltrado inflamatorio corroboró los hallazgos histológicos, mostrando un incremento de células leucocitarias (CD45⁺) en todos los grupos en los que la malla se fijó con el sellador de fibrina. El análisis de la polarización de macrófagos reveló un descenso significativo de los macrófagos de fenotipo M1, junto con un incremento de los M2, cuando se

administraron exosomas, en comparación con la administración del sellador de fibrina solo. El efecto de los exosomas derivados de MSCs en la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 prorregerativo ha sido descrito previamente en un modelo murino de daño muscular (40) y, además, otros estudios han evidenciado también las propiedades inmunomoduladoras de estos exosomas en condiciones *in vitro* frente a linfocitos T activados (33), en modelos animales de sinovitis (34) y en enfermedades cardiovasculares (41). Por último, en relación al efecto de los exosomas derivados de MSCs sobre las células B, hay estudios que muestran su capacidad para inhibir la activación de estos linfocitos *in vitro* (42,43), lo que coincide con nuestros resultados *in vivo*, en los que se observa un descenso significativo de los linfocitos B activados caracterizados como CD45+/B220+/Ly6C+ (44) en los tejidos en los que las mallas se fijaron con sellador de fibrina y exosomas, en comparación con aquellos que únicamente llevaban sellador de fibrina.

Para realizar una caracterización más profunda de la respuesta inflamatoria, se realizó un análisis de la expresión de diferentes genes en el tejido adyacente a las mallas implantadas. Nuestros resultados mostraron un incremento significativo de las citoquinas TH2 IL-4 e IL-13 en los animales en los que el sellador de fibrina se administró junto a MSCs o exo-MSCs. Ambas citoquinas se asocian a la polarización de macrófagos desde un fenotipo M1 hacia M2 (45). Además, considerando que la expresión divergente de Arg-1 e iNOS se ha relacionado frecuentemente con los fenotipos M2 y M1, respectivamente (46), consideramos conveniente estudiar también la expresión de estos dos genes. La expresión de Arg-1 se vio significativamente incrementada en el grupo que recibió MSCs, en comparación con los grupos donde las mallas se fijaron con suturas o con el sellador de fibrina. Además, los niveles de expresión de iNOS se encontraron muy por debajo de los de Arg-1 en todos los grupos. Por último, se apreciaron diferencias significativas en la expresión de Opn, una proteína secretada por los macrófagos, entre otras células, y responsable del desequilibrio Th1/Th2 hacia Th1 (47). En concreto, esta proteína disminuyó significativamente en todos los grupos con sellador de fibrina, en comparación con el grupo en el que las mallas se fijaron con suturas. Tanto los resultados de la expresión de Arg-1 e iNOS como los de Opn, por tanto, son consistentes con la polarización de macrófagos hacia M2, sugerida también por los niveles de expresión de las citoquinas IL-4 e IL-13.

Los resultados del análisis de las poblaciones celulares infiltradas junto con el estudio de la expresión de genes relacionados con la inflamación muestran que, aunque no se observó una disminución de la respuesta inflamatoria en términos de células CD45⁺ –una respuesta que, como se mencionó anteriormente, podría ser beneficiosa para la incorporación de tejido–, existe una modulación de esta respuesta hacia un perfil prorregerativo y menos agresivo, lo que podría suponer un riesgo menor de

desarrollar una respuesta exacerbada en la reacción a cuerpo extraño, sin disminuir, a su vez, la capacidad de incorporar nuevo tejido para reforzar la zona dañada.

Por último, el análisis de la expresión de los genes mayoritarios de colágeno tipo I y colágeno tipo III mostró una disminución significativa de ambos en todos los grupos en los que se empleó el sellador de fibrina, en comparación con el grupo en el que se emplearon suturas. Además, el ratio entre los colágenos tipo I y tipo III mostró un descenso significativo en el grupo con MSCs en comparación con el grupo en el que se empleó únicamente el sellador de fibrina. Teniendo en cuenta que la formación de las hernias y su recurrencia se asocia con una disminución del ratio entre los colágenos tipo I y tipo III (48), estos resultados podrían indicar que la fijación de las mallas con el sellador de fibrina podría incrementar la resistencia biomecánica de las mallas quirúrgicas al tener fibras de colágeno más gruesas en el tejido adyacente.

5. CONCLUSIONES

En un modelo *in vivo* de hernia incisional en ratón se ha demostrado que los selladores de fibrina pueden emplearse como vehículo para la administración de MSCs y de sus exosomas en el contexto de la fijación de mallas quirúrgicas. La identificación histológica y celular de los leucocitos infiltrados demuestra que los exo-MSCs reducen la infiltración de macrófagos inflamatorios M1. Por último, el análisis de expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria corroboró esta observación, mostrando una predominancia de citoquinas relacionadas con la respuesta Th2, y con ello, con la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio, en el tejido circundante a las mallas en las que se vehicularon MSCs o sus exosomas.

6. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

7. AGRADECIMIENTOS

Los experimentos *in vitro* se desarrollaron en la ICTS Nanbiosis (Unidad 14: *Cell Therapy* del CCMIJU). La caracterización de exosomas se llevó a cabo en la ICTS Nanbiosis (Unidad 6: *Biomaterial Processing and Nanostructuring Unit*). Los experimentos *in vivo* se desarrollaron en la ICTS Nanbiosis (Unidad 22: *Animal housing* del CCMIJU). El Servicio de técnicas aplicadas a la biociencia del SAIUEx (financiado por la UEx, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER y FSE) proporcionó apoyo técnico y humano en el desarrollo de este estudio.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el CIBER-CV (CB16/11/00494), una ayuda de la Junta de Extremadura (Ayuda a grupos catalogados de la Junta de Extremadura, GR15175), dos ayudas de la Junta de Extremadura a JGC (TA13042 y IB16168 cofinanciadas por FEDER/FSE) y una ayuda del ISCIII a JGC (CP17/00021) cofinanciada por ERDF/ESF, “*Investing in your future*”. Las entidades financiadoras no intervinieron en el diseño del estudio, recogida de datos y su análisis, decisión de publicación ni

preparación del manuscrito.

8. REFERENCIAS

1. Arap A, Francisco J, Sierra G, Carlos J. Hernia incisional: definición, diferencia con la evisceración, clasificación, diagnóstico positivo y diferencial, profilaxis y tratamiento. *Rev Cuba Cir* 2011; 50(3): 388–400.
2. Schulz SM, Uherek PF, Mejias GP. Hernia incisional. *Cuad Cir* 2003; 17(1): 103–11.
3. Brown C, Finch J. Which mesh for hernia repair? *Ann R Coll Surg Engl* 2010; 92(4): 272–8.
4. Claus CMP, Rocha GM, Campos ACL, *et al.* Prospective, randomized and controlled study of mesh displacement after laparoscopic inguinal repair: fixation versus no fixation of mesh. *Surg Endosc* 2016; 30(3): 1134–40.
5. Garcia-Vallejo L, Couto-Gonzalez I, Concheiro-Coello P, *et al.* Cyanoacrylate surgical glue for mesh fixation in laparoscopic total extraperitoneal hernia repair. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2014; 24(3): 240–3.
6. Fortelny RH, Petter-Puchner AH, Glaser KS, Redl H. Use of fibrin sealant (Tisseel/Tissucol) in hernia repair: a systematic review. *Surg Endosc* 2012; 26(7): 1803–12.
7. Sanders DL, Waydia S. A systematic review of randomised control trials assessing mesh fixation in open inguinal hernia repair. *Hernia* 2014; 18(2): 165–76.
8. Powell BS, Voeller GR. Current developments in hernia repair; meshes, adhesives, and tacking. *Surg Technol Int* 2010; 20: 175–81.
9. Petter-Puchner AH, Fortelny R, Mittermayr R, *et al.* Fibrin sealing versus stapling of hernia meshes in an onlay model in the rat. *Hernia* 2005; 9(4): 322–9.
10. van der Ham AC, Kort WJ, Weijma IM, *et al.* Effect of fibrin sealant on the healing colonic anastomosis in the rat. *Br J Surg* 1991; 78(1): 49–53.
11. Hanson AJ, Quinn MT. Effect of fibrin sealant composition on human neutrophil chemotaxis. *J Biomed Mater Res.* 2002; 61(3): 474–81.
12. Ahmed TAE, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14(2): 199–215.
13. Cox S, Cole M, Tawil B. Behavior of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng* 2004; 10(5–6): 942–54.
14. Barbizan R, Castro MV, Barraviera B, *et al.* Influence of delivery method on neuroprotection by bone marrow mononuclear cell therapy following ventral root reimplantation with fibrin sealant. *PloS One* 2014; 9(8): e105712.
15. Reichenberger MA, Mueller W, Hartmann J, *et al.* ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineural suturing in a rat model. *Microsurgery* 2016; 36(6): 491–500.
16. Hao C, Wang Y, Shao L, *et al.* Local Injection of Bone Mesenchymal Stem Cells and Fibrin Glue Promotes the Repair of Bone Atrophic Nonunion In Vivo. *Adv Ther* 2016; 33(5): 824–33.
17. Manunta AF, Zedde P, Pilicchi S, *et al.* The use of embryonic cells in the treatment of osteochondral defects of the knee: an ovine in vivo study. *Joints* 2016; 4(2): 70–9.
18. Mehanna RA, Nabil I, Attia N, *et al.* The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media Topically Delivered in Fibrin Glue on Chronic Wound Healing in Rats. *BioMed Res Int* 2015; 2015: 846062.
19. Roura S, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. Fibrin, the preferred scaffold for cell transplantation after myocardial infarction? An old molecule with a new life. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11(8): 2304–13.
20. Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, *et al.* Surgical meshes coated with mesenchymal stem cells provide an anti-inflammatory environment by a M2 macrophage polarization. *Acta Biomater* 2016; 31: 221–30.
21. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med* 2011; 6(4): 481–92.
22. Biondo-Simões MLP, Moura PAP, Colla K, *et al.* Inflammatory reaction and tensile strength of the abdominal wall after an implant of polypropylene mesh and polypropylene/poliglecaprone mesh for abdominal wall defect treatment in rats. *Acta Cir Bras* 2014; 29 Suppl 1: 45–51.
23. Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V. Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials* 1998; 19(24): 2235–46.
24. Barski D, Gerullis H, Georgas E, *et al.* Coating of mesh grafts for prolapse and urinary incontinence repair with autologous plasma: exploration stage of a surgical innovation. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 296498.
25. Gerullis H, Georgas E, Eimer C, *et al.* Coating with autologous plasma improves biocompatibility of mesh grafts in vitro: development stage of a surgical innovation. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 536814.
26. Junge K, Rosch R, Klinge U, *et al.* Titanium coating of a polypropylene mesh for hernia repair: effect on biocompatibility. *Hernia* 2005; 9(2): 115–9.
27. Schon LC, Gill N, Thorpe M, *et al.* Efficacy of a mesenchymal stem cell loaded surgical mesh for tendon repair in rats. *J Transl Med* 2014; 12: 110.
28. Zhang Y, Zhou Y, Zhou X, Zhao B, Chai J, Liu H, *et al.* Preparation of a nano- and micro-fibrous decellularized scaffold seeded with autologous mesenchymal stem cells for inguinal hernia repair. *Int J Nanomedicine.* 2017 Feb 21;12:1441–52.

29. Wassenaar E, Schoenmaeckers E, Raymakers J, *et al.* Mesh-fixation method and pain and quality of life after laparoscopic ventral or incisional hernia repair: a randomized trial of three fixation techniques. *Surg Endosc* 2010; 24(6): 1296–302.
30. Chatzimavroudis G, Kalaitzis S, Voloudakis N, *et al.* Evaluation of four mesh fixation methods in an experimental model of ventral hernia repair. *J Surg Res* 2017; 212: 253–9.
31. Berninger MT, Wexel G, Rummeny EJ, *et al.* Treatment of osteochondral defects in the rabbit's knee joint by implantation of allogeneic mesenchymal stem cells in fibrin clots. *J Vis Exp* 2013; (75): e4423.
32. Ho W, Tawil B, Dunn JCY, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng* 2006; 12(6): 1587–95.
33. Blázquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, *et al.* Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells. *Front Immunol* 2014; 5: 556.
34. G Casado J, Blázquez Durán R, Vela FJ, *et al.* Mesenchymal stem cells derived exosomes: immunomodulatory evaluation in an antigen-induced synovitis porcine model. *Front Vet Sci* 2017; 4: 39.
35. Wolberg AS. Determinants of fibrin formation, structure, and function. *Curr Opin Hematol* 2012; 19(5): 349–56.
36. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MPM. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006; 4(5): 932–9.
37. Topart P, Vandenbroucke F, Lozac'h P. Tisseel versus tack staples as mesh fixation in totally extraperitoneal laparoscopic repair of groin hernias: a retrospective analysis. *Surg Endosc* 2005; 19(5): 724–7.
38. Katkhouda N, Mavor E, Friedlander MH, *et al.* Use of fibrin sealant for prosthetic mesh fixation in laparoscopic extraperitoneal inguinal hernia repair. *Ann Surg* 2001; 233(1): 18–25.
39. Zogbi L. The Use of Biomaterials to Treat Abdominal Hernias. En: Pignatello R, Ed. *Biomaterials Applications for Nanomedicine* (Internet). InTech 2011 (2017 Sep 23). Disponible en (<http://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/the-use-of-biomaterials-to-treat-abdominal-hernias>).
40. Lo Sicco C, Reverberi D, Balbi C, *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(3): 1018–28.
41. Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, *et al.* Stem cell-derived exosomes as a therapeutic tool for cardiovascular disease. *World J Stem Cells* 2016; 8(9): 297–305.
42. Cosenza S, Toupet K, Maumus M, *et al.* Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics* 2018; 8(5): 1399–410.
43. Di Trapani M, Bassi G, Midolo M, *et al.* Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci Rep* 2016; 6: 24120.
44. Wrammert J, Källberg E, Agace WW, Leanderson T. Ly6C expression differentiates plasma cells from other B cell subsets in mice. *Eur J Immunol* 2002; 32(1): 97–103.
45. Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, *et al.* Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev* 2013; 9(5): 620–41.
46. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122(3): 787–95.
47. Rittling SR. Osteopontin in macrophage function. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13: e15.
48. Henriksen NA, Yadete DH, Sorensen LT, *et al.* Connective tissue alteration in abdominal wall hernia. *Br J Surg* 2011; 98(2): 210–9.



Telomere function and sirtuins 1 and 6 in colorectal cancer from obese and non-obese patients. Clinical correlations

Title in Spanish: *Función telomérica y sirtuinas 1 y 6 en cáncer colorrectal en pacientes obesos y no obesos. Correlaciones clínicas*

Sergio García Martínez^{1,3,*}, Juan Fernández García-Moreno^{1,3}, Ana Barabash Bustelo³, Carmen de Juan Chocano^{1,3}, Antonio-José Torres García^{2,3}, Pilar Iniesta Serrano^{1,3}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid. ²Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo. Hospital Clínico San Carlos. 28040-Madrid. ³Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos. Hospital Clínico San Carlos. 28040-Madrid.

ABSTRACT: Telomere dysfunction is a frequent event in colorectal cancer (CRC). The aim of this study consists of analyzing telomere status and sirtuins 1 and 6, in relation to the prognosis of patients affected by CRC. We have also investigated the possible relationship between obesity and the predisposition to develop CRC. Telomere function parameters, such as telomere length and telomerase activity, as well as the relative expression of *SIRT1* and *SIRT6* in samples of colorectal tumor tissue, non-tumor tissue (control), and subcutaneous and omental adipose tissues have been investigated. The telomere length was determined by TRF (Telomere Restriction Fragment) and quantitative PCR (qRT-PCR). The relative expression of *SIRT1* and *SIRT6* was assessed by qRT-PCR. The critically shortened tumor telomeres were associated with a favorable clinical prognosis in CRC and correlate with the higher expression levels of *SIRT1*. Reduced expression of *SIRT1* ($RQ \leq 0.5$) was detected in tumors that confer a more adverse clinical evolution. The telomeres of the non-tumor cells from obese or overweight patients were significantly longer than those of patients showing normal weight. In omental adipose tissue, telomere length was lower in obese patients with CRC than in obese patients without CRC. Analyses of the telomeric length and *SIRT1* seem of interest in the investigation of the clinical evolution of subjects affected by CRC and in the establishment of the predisposition of obese individuals to the development of this tumor type.

RESUMEN: La disfunción telomérica constituye un evento frecuente en el cáncer colorrectal (CCR). El objetivo de este trabajo consiste en analizar el estatus telomérico y las sirtuinas 1 y 6, en relación con el pronóstico de pacientes afectados de CCR. Asimismo, se investiga la posible relación existente entre la obesidad y la predisposición a desarrollar CCR. Se han investigado parámetros de función telomérica, como la longitud de los telómeros y la actividad telomerasa, así como la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en muestras de tejido tumoral colorrectal, tejido no tumoral (control), y tejidos adiposos subcutáneo y omental. La longitud telomérica se determinó por las técnicas TRF (*Telomere Restriction Fragment*) y por PCR cuantitativa (qRT-PCR). La expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* se evaluó por qRT-PCR. Los telómeros tumorales críticamente acortados se relacionan con un pronóstico clínico favorable en CCR y se correlacionan con los niveles de expresión más elevados de *SIRT1*. La expresión reducida de *SIRT1* ($RQ \leq 0,5$) se detecta en tumores que confieren una evolución clínica más adversa. Los telómeros de las células no tumorales de pacientes obesos o con sobrepeso son significativamente más largos que los de pacientes con normopeso. En tejido adiposo omental, la longitud telomérica relativa es inferior en pacientes obesos con CCR respecto a pacientes obesos sin CCR. El análisis de la longitud telomérica y de *SIRT1* presenta interés en la investigación de la evolución clínica de sujetos afectados de CCR y en el establecimiento de la predisposición de individuos obesos al desarrollo de este tipo tumoral.

*Corresponding Author: sergga05@ucm.es

Received: March 13, 2018 Accepted: March 19, 2018

An Real Acad Farm Vol. 84, N° 1 (2018), pp. 52-71

Language of Manuscript: Spanish

Premio Juan Abelló en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

1. INTRODUCCIÓN

Los telómeros son un complejo DNA-proteínas localizados en los extremos de los cromosomas lineales de las células eucariotas. El DNA telomérico es un DNA bicatenario, no codificante, que contiene un número variable de secuencias 5'-(TTAGGG)_n-3' repetidas en tándem, seguido de un extremo monocatenario (facilita la formación de la estructura de “*T-loop*” que impide que los telómeros sean reconocidos por la maquinaria de reparación *DNA Damage Responsive* o DDR). En humanos, las proteínas asociadas a los telómeros se denominan complejo *sheltering* y lo constituyen 3 subunidades llamadas TRF1 y 2 (se unen a las secuencias TTAGGG), y POT1 (se une al extremo monocatenario de los telómeros), además de otras proteínas adicionales tales como TIN2, TPP1 o RAP1 (forman un complejo que permite a la maquinaria DDR discernir entre la región telomérica y regiones dañadas del DNA). Por ello, los telómeros constituyen uno de los principales elementos necesarios para la estabilidad genómica (1, 2).

Además, los telómeros también regulan la expresión génica mediante el silenciamiento de genes localizados cerca de los estos (suceso denominado *Telomere Position Effect* o TPE) y a través de regiones teloméricas que contienen repeticiones de RNA llamadas TERRA (ncRNA que se transcribe a partir de DNA telomérico gracias a la RNA polimerasa II) que participan en la regulación de la telomerasa, organización de la heterocromatina de los telómeros, regulación de la expresión génica y activación del sistema DDR en telómeros disfuncionales (2).

En la población humana normal, la longitud de los telómeros es heterogénea, ya que varía entre 5 y 15 kb, estando influenciada por factores tanto genéticos como ambientales (3). Sin embargo, en cada proceso mitótico, los telómeros se acortan en un promedio de 50-150pb como consecuencia del problema de la replicación terminal: en cada ciclo de división celular, los telómeros se acortan dada la incapacidad de las DNA polimerasas convencionales de poder completar la replicación de los extremos de las nuevas cadenas de DNA. Este acortamiento provoca que los extremos de los telómeros se “desacoplen” y aparezca inestabilidad genómica, aunque la célula cuenta con dos “barreras” de protección, denominadas senescencia replicativa y crisis. La primera se caracteriza por la inhibición de la proliferación celular que, si es superada, la célula pasa a un periodo de división celular extendido y se llega a la segunda “barrera” o estadio de crisis, donde los cromosomas pueden llegar a fusionarse y desencadenar muerte celular por apoptosis (4). Si esto no se consigue, la célula puede sufrir una transformación oncogénica, lo cual está directamente relacionado con la salud y la esperanza de vida de los individuos. La disfunción telomérica ha sido asociada con un incremento en la incidencia de diferentes enfermedades, entre ellas destaca el cáncer, si bien son muchas las patologías humanas que se caracterizan por la presencia de telómeros acortados, tales como enfermedades cardíacas o

la obesidad. Debido a esto, numerosos datos epidemiológicos relacionan la obesidad con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer, entre ellos el cáncer colorrectal (CCR), debido a que la inflamación subclínica derivada de la grasa visceral puede incidir directa o indirectamente en el microambiente tumoral (5, 6).

Las células tumorales, de manera general, cuentan con secuencias teloméricas acortadas. Este acortamiento es propuesto como un mecanismo antitumoral, puesto que evita que células con disfunción telomérica proliferen y sufran importantes aberraciones cromosómicas. Sin embargo, si los mecanismos de control no funcionan correctamente, el acortamiento telomérico genera una elevada inestabilidad cromosómica, lo cual es una característica principal del cáncer. Como consecuencia, en una selección posterior de células tumorales se reactivaría la telomerasa, que garantizaría un potencial replicativo ilimitado (7). La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico encargado de sintetizar las repeticiones de DNA telomérico en el extremo 3' de los cromosomas lineales. Para ello presenta acción transcriptasa reversa gracias a una subunidad denominada TERT (codificada por el gen hTERT en el cromosoma 5 en humanos) y a un componente RNA llamado hTERC (codificado en humanos por el gen hTERC en el cromosoma 3) que actúa como molde para la síntesis de dicho DNA. La telomerasa también participa en la regulación de la expresión génica, proliferación celular y apoptosis, adhesión y migración celular (2). Además de la telomerasa, aproximadamente el 15% de los tumores humanos mantienen sus telómeros mediante un mecanismo alternativo a la enzima denominado ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*), basado en procesos de recombinación del DNA donde la región telomérica de un cromosoma puede ser translocada a la región telomérica de otro cromosoma, con intervención de proteínas de reparación del DNA como el complejo MRN, ATRX o BRCA1 (8).

Sin embargo, actualmente la regulación y dinámica del mantenimiento de los telómeros no está completamente establecida, ya que en células que adquieren oncogenicidad, este acortamiento tiene función supresora puesto que limita su capacidad replicativa, pero en ausencia de aquellas moléculas relacionadas con senescencia celular generaría una inestabilidad genómica que contribuiría al avance del proceso tumorigénico (9).

Teniendo en cuenta que la obesidad severa se asocia con un estado de inflamación crónica, resulta importante el papel que puedan desempeñar las sirtuinas. Son una familia de proteínas con actividad desacetilasa NAD⁺ dependiente y mono-[ADP-ribosil] transferasa que tienen como principal función la detección de cambios en el estado redox de las células provocados por estrés (oxidativo, metabólico, genotóxico, etc.). En mamíferos, la familia de sirtuinas está integrada por 7 miembros (SIRT1-7) que difieren en su localización, actividad y funciones: SIRT1, 6 y 7 se localizan principalmente en el núcleo; SIRT2 y 3 en el citoplasma y mitocondria respectivamente (aunque presentan niveles limitados en el núcleo); y SIRT4

y 5 son estrictamente mitocondriales. Todas estas sirtuinas realizan múltiples funciones que pueden ser clasificadas en 4 procesos principales: regulación de la cromatina, supervivencia celular bajo estrés, regulación de la homeostasis metabólica, y desarrollo y diferenciación celular (10). También están relacionadas con varias vías inflamatorias, donde algunos de sus miembros parecen estar implicados en el mantenimiento de los telómeros.

En humanos, se ha propuesto la participación de SIRT1 y SIRT6 en el mantenimiento de la longitud y función telomérica, ya que estudios recientes demuestran que la reducción de los niveles de SIRT6 se relaciona con disfunción telomérica y SIRT1 promueve senescencia replicativa en respuesta a estrés oxidativo crónico (11, 12). Es por ello que en los últimos años hay evidencias claras de la potencialidad que las sirtuinas pueden tener en terapia humana, aunque son necesarios trabajos de investigación que aclaren estas perspectivas. Además, otros trabajos también han establecido variaciones en los niveles de sirtuinas (principalmente SIRT1 y 6) en pacientes obesos antes y después de perder peso, lo que sería indicativo de que la obesidad y la actividad de estas proteínas y, en conclusión, el cáncer están relacionados (13).

Por ello, y considerando los datos anteriores, el presente trabajo plantea la posibilidad de explorar nuevos marcadores moleculares relacionados con función telomérica que permitan obtener un mejor conocimiento de aquellos mecanismos que subyacen en pacientes obesos que desarrollan CCR, además de contribuir a mejorar la capacidad para establecer el pronóstico clínico y a la identificación de nuevas dianas terapéuticas en relación con la obesidad y el cáncer. En el desarrollo del presente trabajo se han considerado pacientes afectados de CCR, obesos y no obesos, así como pacientes obesos sin cáncer.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Pacientes y muestras tisulares

El presente trabajo se realizó con muestras de tejidos humanos congelados proporcionadas por el Biobanco del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC) o registradas como colección de muestras (C.0001253) del mismo hospital, todas ellas procedentes de pacientes que han sido sometidos a cirugía de intención curativa en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del citado hospital. De forma previa al estudio, se asegura a los pacientes la confidencialidad de datos, de acuerdo con la normativa establecida en la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre). Asimismo, se dispone de los consentimientos informados de los pacientes para donación de muestras biológicas.

Los sujetos y muestras considerados en este estudio corresponden a los siguientes grupos:

Casos: pacientes con CCR que presenten un Índice de Masa Corporal (IMC) superior a 30Kg/m^2 en el momento de la cirugía.

Controles:

Sujetos con $\text{IMC} > 30\text{Kg/m}^2$ sin cáncer, que vayan a ser sometidos a cirugía electiva o que vayan a ser sometidos a cirugía bariátrica ($\text{IMC } 30\text{-}45\text{Kg/m}^2$).

Pacientes con CCR con $\text{IMC habitual} < 30\text{Kg/m}^2$.

Los pacientes y muestras tisulares consideradas en el trabajo se indican en la **Tabla 1**. Las muestras de tejido colorrectal, tumorales y no tumorales, una vez resecaadas por cirugía, se envían al Biobanco para realizar los estudios anatomopatológicos pertinentes y ser almacenadas a -80°C en *Tissue Teck*[®] (Sakura) hasta el momento de su utilización; las muestras de tejido adiposo se incluyen en un reactivo que mantiene la integridad del RNA denominado *RNAlater*[®] (Qiagen) y se congelan también a -80°C hasta su procesamiento.

Tabla 1. Clasificación de los grupos de pacientes y muestras tisulares objeto de estudio.

GRUPO	Nº PACIENTES	TIPO DE MUESTRA
Tejido colorrectal		
Pacientes con CCR	60	Tejido colorrectal tumoral y tejido no tumoral (control, a 10 cm del margen del tumor).
Tejido adiposo		
Pacientes con CCR (IMC variable)	80	Tejido adiposo subcutáneo (SC) y tejido adiposo omental (O).
Pacientes obesos sin CCR (IMC > 30)	60	Tejido adiposo subcutáneo (SC) y tejido adiposo omental (O).

En los análisis de tejidos adiposos, para el grupo de pacientes obesos con CCR se utilizó como control el grupo

de pacientes obesos sin CCR cuando se pretende estudiar el efecto del CCR sobre alguna de las variables analizadas,

mientras que para analizar el efecto que tiene la obesidad sobre dichas variables se utilizó como control el grupo de pacientes no obesos con CCR.

Al comienzo del estudio se recogieron datos de peso y talla para determinar el IMC de los pacientes; y en la población de tumores analizada se tuvieron en cuenta las siguientes variables clínico-patológicas: estadio de Dukes

(A, B, C y D), sistema TNM (T1, 2, 3 ó 4; N0, 1 ó 2; M0 ó 1) y recidiva tumoral, con un seguimiento clínico de la población (supervivencia global) de 60 meses.

A continuación, en las **Tablas 2, 3 y 4** se detalla el espacio muestral de cada grupo junto con las distintas variables clínico-patológicas:

Tabla 2. Características clínicas de los tumores y pacientes del grupo 1

GRUPO 1: PACIENTES AFECTADOS DE CCR		
	Variable	N
Sexo		60
	Femenino	33
	Masculino	27
Estadio Dukes		60
	A	12
	B	30
	C	12
	D	6
T, tumor primario		60
	T1	3
	T2	12
	T3	38
	T4	7
N, invasión ganglionar		60
	N0	43
	N1	9
	N2	7
M, metástasis		60
	M0	45
	M1	15
Recidiva		60
	Si	52
	No	8
IMC		60
	18,5-24,9	19
	25-29,9	28
	>30	13

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes del grupo 2.

GRUPO 2: PACIENTES AFECTADOS DE CCR		
	Variable	N
Sexo		80
	Femenino	30
	Masculino	50
IMC		80
	18,5-24,9	21
	25-29,9	40

>30

19

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes del grupo 3.**GRUPO 3: PACIENTES OBESOS SIN CCR**

Variable	N
Sexo	60
Femenino	44
Masculino	16
IMC	60
18,5-24,9	0
25-29,9	0
>30	60

2.2. Análisis de la función telomérica

La función telomérica fue evaluada en las muestras objeto de estudio mediante la determinación de la longitud de las secuencias teloméricas y de la actividad telomerasa.

2.2.a. Determinación de la longitud telomérica

La extracción de DNA genómico se realizó siguiendo el protocolo de Blin y Stafford (14) adaptado. La cuantificación de la longitud telomérica (LT) para muestras de tejido tumoral se realizó mediante el análisis de los Fragmentos de Restricción (TRF) y mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR), mientras que para las muestras de tejido adiposo únicamente se llevó a cabo mediante qRT-PCR.

2.2.a.i. Análisis por Telomere Restriction Fragment (TRF)

En esta técnica se utilizó el kit *Telo TAAGGG Telomere Length Assay* (Roche). El DNA genómico obtenido se digirió con enzimas de restricción HinfI y RsaI (degradan todo el DNA genómico excepto las regiones teloméricas y subteloméricas), los fragmentos se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a una membrana de nailon mediante *Southern blotting*. Después, el DNA transferido se hibridó con una sonda marcada con digoxigenina (de unión específica a las regiones teloméricas) y se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina (unido covalentemente a la enzima fosfatasa alcalina), para posteriormente incubarlo con el sustrato CDP-Star, que genera una señal quimioluminiscente que permite visualizar los distintos fragmentos teloméricos en un film de revelado.

Para analizar los resultados se utilizó el software *Image Gauge 3.46*, donde el valor de la longitud telomérica

media en Kb y en referencia a un patrón de peso molecular estándar fue definido como:

$$\text{Longitud telomérica media (Kb)} = \frac{\sum \text{OD}_i}{\sum (\text{OD}_i / \text{Li})}$$

OD_i = señal quimioluminiscente

Li = longitud del TRF de la posición (i)

i = posición a lo largo de la calle de la muestra

El grado de acortamiento telomérico en el tumor respecto al control (ratio T/N) se determinó mediante el cociente TRF tumor/TRF control.

2.2.a.ii. Análisis por qRT-PCR

Esta técnica se basa en la teoría de que la longitud telomérica relativa de una muestra (ratio T/S) viene dada por el número de copias de su secuencia telomérica (T) dividida entre el número de copias de un gen de copia única (S), respecto al de un DNA de referencia. En este caso, el gen de copia única utilizado fue *RPLPO* y como DNA de referencia se empleó el de la línea celular HeLa.

Se realizaron dos reacciones de amplificación por muestra, cada una de ellas por triplicado, donde cada pocillo contenía 10ng DNA/μl y los reactivos indicados en la **Tabla 5**. En el caso de la reacción de amplificación de la secuencia telomérica, se emplearon los *primers* correspondientes a telómeros (*TEL*) y para la amplificación del gen *RPLPO* los *primers* correspondientes a dicho gen (*RPLPO*), todos detallados en la **Tabla 6**:

Tabla 5. Mezcla de reacción para determinación de la longitud telomérica por qRT-PCR.

COMPONENTES	VOLUMEN (µl) POR POCILLO
<i>SYBR Green</i> [®] <i>Master Mix</i> (2X)	5
<i>Primer TEL reverse</i> (10µM)	0,9
<i>Primer TEL forward</i> (10mM)	0,3
<i>Primer RPLPO reverse</i> (10mM)	0,5
<i>Primer RPLPO forward</i> (10mM)	0,3
AUE (Agua Ultrapura Estéril) (<i>TEL/RPLPO</i>)	1,8/2,2
TOTAL	8

Tabla 6. Secuencia de los *primers* de *TEL* y *RPLPO*.

<i>Primer TEL reverse</i>	5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'
<i>Primer TEL forward</i>	5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'
<i>Primer RPLPO reverse</i>	5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
<i>Primer RPLPO forward</i>	5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

Para cada pareja de *primers* se construyó una curva estándar a través de diluciones seriadas del DNA de HeLa que permitieron calcular la eficiencia (E) de la prueba. Una vez obtenida la E, el cálculo de la longitud telomérica

relativa de cada muestra con respecto al DNA de referencia se realizó siguiendo la fórmula descrita por Pfaffl (15):

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

$$\text{Ratio T/S} = \frac{E_{TEL}^{(Ct\ DNA\ referencia - Ct\ DNA\ muestra)}}{E_{RPLPO}^{(Ct\ DNA\ referencia - Ct\ DNA\ muestra)}}$$

2.2.b. Determinación de la actividad telomerasa

La detección de la actividad telomerasa se realizó empleando el kit comercial *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA*[®] (Roche), que se basan en una ampliación del método descrito por Kim et al. (16). La técnica se realiza en dos pasos, donde en el primero la enzima telomerasa añade repeticiones teloméricas (TTAGGG) al extremo 3' del cebador sintético biotinilado P1-TS, que serán amplificados por PCR usando los cebadores P1-TS y P2, generando así secuencias que difieren de tamaño en 6pb.

En un segundo paso, los fragmentos amplificados por PCR son desnaturalizados e hibridados con una sonda específica marcada con digoxigenina (P3), con una secuencia complementaria a la de las repeticiones teloméricas. El producto obtenido se inmoviliza en los pocillos recubiertos de estreptavidina de una placa de ELISA gracias a que el cebador está marcado con biotina,

y dicho producto es detectado con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa que, al reaccionar con la tetrametilbenzidina, su sustrato, genera un producto de color azul cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de DNA telomérico añadido por la telomerasa. Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, lo que provoca el viraje a color amarillo.

Utilizando el programa bioinformático Microplate manager[®] (Bio-Rad) se mide la absorbancia de cada pocillo a 450nm empleando una longitud de onda de referencia de 690nm, donde aquellas muestras en las que la diferencia de absorbancias es superior a 0,2 se consideran "telomerasa positivas".

2.3 Ensayos de expresión génica de *SIRT1* y *SIRT6* por qRT-PCR

Previamente se realizó la extracción y purificación de los RNAs procedentes de los cortes de tejido (tumoraes,

no tumorales y adiposo), mediante el método de Chomczynski y Sacchi (17) mejorado, utilizando *TRIzol*[®] (Invitrogen). Seguidamente se sintetizaron los cDNA (DNA complementario) empleando el kit *Hight-Capacity cDNA Reverse Transcriptions*[®] (Applied Biosystem) con

Tabla 7. Ensayos de expresión de *SIRT1* y *SIRT6*; mezcla de reacción para la transcripción reversa.

COMPONENTES	VOLUMEN (μl) POR REACCIÓN
Tampón 10X de transcripción reversa	10
Mezcla dNTPs 25X	4
Mezcla Random Primers 10X	10
Enzima Transcriptasa Reversa (50U/μl)	5
Inhibidor de RNasa	2,5
AUE (Agua Ultrapura Estéril)	18,5
RNA	2μ en 50μl
TOTAL	100

Para realizar la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) se utilizó la mezcla de reactivos detallada en la **Tabla 8**. El reactivo *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay 20X* (Applied Biosystems) incluye dos cebadores para amplificar la secuencia deseada y la sonda *TaqMan MGB* (6-FAM dye-labeled)[®] para detectarla (Hs00966002_m1 para *SIRT1*, Hs01009005_m1 para *SIRT6* y Hs99999905_m1 para *GAPDH*). La mezcla de reacción

la mezcla indicada en la **Tabla 7** y las condiciones proporcionadas por la casa comercial. Para comprobar que la reacción se había producido correctamente, se realizó una PCR de comprobación utilizando cebadores exón-exón para el gen *GAPDH*.

previamente detallada se cargó por triplicado, y como control negativo se utilizó AUE (Agua Ultra Estéril) en lugar de cDNA. Para las muestras de tejido tumoral, el control está integrado por un *pool* de tejidos no tumorales, mientras que para el tejido adiposo se cuenta con dos controles: cDNAs de pacientes obesos sin CCR (control de pacientes obesos con CCR) y de pacientes no obesos con CCR (control de pacientes obesos con CCR).

Tabla 8. Ensayos de expresión de *SIRT1* y *SIRT6*; mezcla de reacción para qRT-PCR.

COMPONENTES	VOLUMEN (μl) POR REACCIÓN
<i>TaqMan</i> [®] <i>Gene Expression Assay 20X</i>	10
<i>TaqMan</i> [®] <i>Universal PCR Master Mix 2X</i>	1
AUE (Agua Ultra Estéril)	8
cDNA (20ng/μl)	1
TOTAL	20

El análisis de la qPCR se basó en el método comparativo de Ct (*Cycle threshold*). Para las muestras de tejido tumoral de colon, una vez obtenidas las medias de los valores de Ct de la muestra tumoral (Ct gen diana tumor) y del control (Ct gen diana control, formado por un *pool* no tumoral), se normalizaron respecto al valor de Ct del gen *GAPDH* (Ct endógeno) para obtener ΔCt. Al valor ΔCt de cada muestra tumoral se le resta el ΔCt del control para obtener el valor de ΔΔCt. Finalmente, se calculó la

expresión relativa (RQ) del gen diana en cada muestra respecto al control mediante la fórmula $RQ = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Para las muestras de tejido adiposo, el valor ΔCt se obtiene de la misma manera pero el valor de ΔΔCt se obtiene al restar al ΔCt de la muestra la media de ΔCt del *pool* de muestras de tejido adiposo subcutáneo (SC) u omental (O) del grupo control correspondiente.

Para tejido tumoral:

$$\Delta Ct \text{ tumor} = Ct \text{ gen diana del tumor} - Ct \text{ gen endógeno del tumor}$$

$$\Delta Ct \text{ control} = Ct \text{ gen diana control} - Ct \text{ gen endógeno control (GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tumor} - \Delta Ct \text{ control}$$

$$RQ = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Para tejido adiposo:

$$\Delta Ct \text{ adiposo (SC)} = Ct \text{ gen diana adiposo (SC)} - Ct \text{ gen endógeno adiposo (SC)}$$

$$\Delta Ct \text{ adiposo (O)} = Ct \text{ gen diana adiposo (O)} - Ct \text{ gen endógeno adiposo (O)}$$

$$\Delta\Delta Ct \text{ (SC)} = \Delta Ct \text{ adiposo (SC)} - \Delta Ct \text{ del pool adiposo control}$$

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

RQ > 2 → Sobreexpresión.

RQ 0,5-2 → Expresión normal.

RQ < 0,5 → Expresión reducida.

2.4 Análisis estadísticos.

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 22[®], con las pruebas detalladas en la **Tabla 9** (en todos los casos se consideran diferencias significativas si P < 0,05).

Tabla 9. Pruebas aplicadas en los análisis estadísticos

OBJETIVO A EVALUAR	ESTADÍSTICA PARAMÉTRICA	ESTADÍSTICA NO PARAMÉTRICA
Asociación entre una variable categórica y una variable cuantitativa	Variable categórica dicotómica T de Student	U de Mann-Whitney
	Variable categórica de 3 o más categorías ANOVA de una vía	Kruskal-Wallis
Asociación entre dos variables cuantitativas	Correlación de Pearson	Correlación de Spearman

Para estimar las curvas de supervivencia (medida como supervivencia global) se empleó el método de Kaplan-Meier, y el test de Log-Rank para compararlas entre sí. En los estudios de supervivencia se excluyó a aquellos pacientes que habían fallecido en el periodo post-operatorio.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de tumores colorrectales.

3.1.a Estatus telomérico y su relación con las variables clínico-patológicas

En el grupo de pacientes con CCR (grupo 1), la longitud telomérica media (LTM, media ± error estándar) fue de 3,80 ± 0,18Kb y de 5,41 ± 0,28 Kb para sus pares no tumorales (controles) (**Figura 1**). La diferencia de LTM entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa (P < 0,001; Test de Wilcoxon) con un valor medio para el ratio T/N (relación entre la LTM tumoral y no tumoral) de 0,74 ± 0,03.

Además, se observó una moderada correlación lineal entre las LT del tejido tumoral y no tumoral (correlación de Spearman = 0,460; P valor asociado < 0,001) (**Figura 2**).

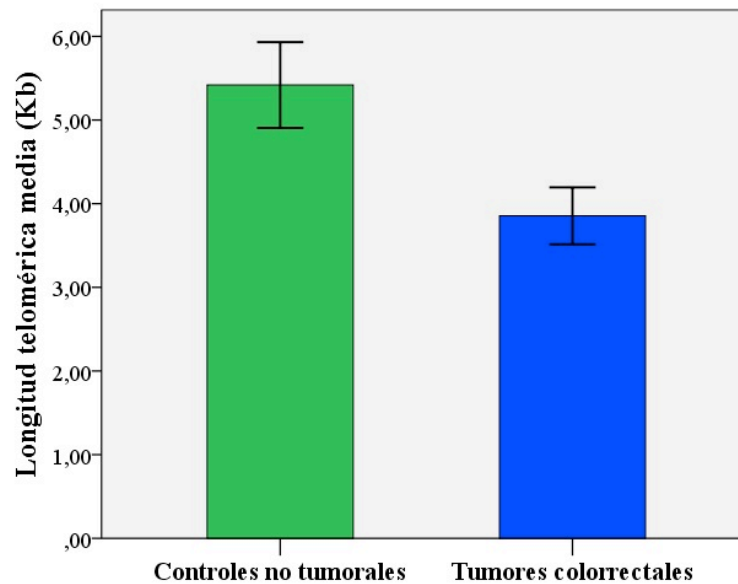


Figura 1. Diagrama de barras referente a la LTM en tumores colorrectales y en los controles no tumorales.

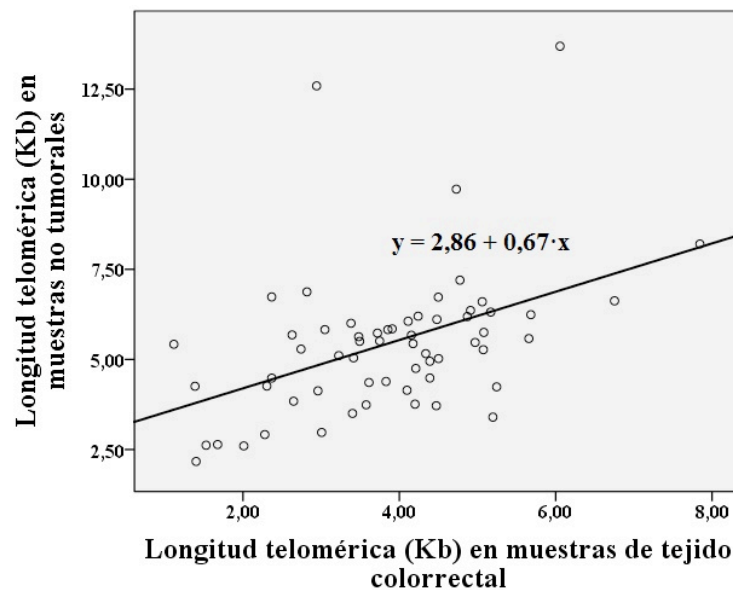


Figura 2. Diagrama de dispersión de las LT (Kb) de las muestras tumorales (eje X) y de las muestras no tumorales (eje Y).

Para las variables clínico-patológicas, se realizó un análisis para evaluar la posible asociación entre estas y el estatus telomérico de los tumores objeto de estudio (**Tabla 10**). De acuerdo con los resultados obtenidos, no se encuentran asociaciones estadísticamente significativas entre la LTM del tejido tumoral o el ratio T/N y las variables clínico-patológicas consideradas.

Seguidamente, la LTMT se dividió en cuartiles poblacionales, de manera que se obtuvo un punto de corte en 3,84Kb, que divide a la población en dos mitades.

Como resultado, se obtuvo una distribución poblacional de las LTMT con diferencias significativas en el estadio A de Dukes frente al resto de estadios ($P = 0,048$; χ^2 de Pearson. **Tabla 11**). Los tumores colorrectales de estadios más avanzados (Dukes B, C y D), en su mayoría tuvieron longitudes teloméricas superiores a 3,84Kb, mientras que sólo un 20% de los tumores con estadio A de Dukes poseían longitudes superiores a dicho punto de corte.

Tabla 10. Asociación entre el estatus telomérico y variables clínico-patológicas en tumores colorrectales; *Longitud telomérica media tumoral; **Grado de diferenciación; #Error estándar de la media

VARIABLE	N	LTMT* (KB) (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA	RATIO (MEDIA ± EE#)	T/N P Y PR. ESTADÍSTICA
Dukes	52	3,82 ± 0,19		0,49 ± 0,06	
A	10	3,45 ± 0,28	P = 0,214 t de Student	0,71 ± 0,05	P = 0,722 t de Student
B, C, D	42	3,9 ± 0,23		0,74 ± 0,04	
T	53	3,86 ± 0,19		0,75 ± 0,03	
T1	2	3,30 ± 0,08	P = 0,561 t de Student	0,60 ± 0,03	P = 0,399 t de Student
T2, T3, T4	51	3,88 ± 0,19		0,75 ± 0,04	
N	52	3,85 ± 0,19		0,74 ± 0,03	
N0		3,96 ± 0,22	P = 0,333 t de Student	0,75 ± 0,04	P = 0,523 t de Student
N1, N2		3,55 ± 0,37		0,70 ± 0,06	
Recidiva	50	3,81 ± 0,2		0,73 ± 0,04	
No	46	3,88 ± 0,21	P = 0,323 t de Student	0,72 ± 0,04	P = 0,394 t de Student
Sí	4	3,15 ± 0,43		0,84 ± 0,06	
G. D**	23	4,01 ± 0,27		0,78 ± 0,05	
Bien	9	4,47 ± 0,51	P = 0,318 ANOVA de un factor	0,75 ± 0,07	P = 0,753 ANOVA de un factor
Moderado	12	3,61 ± 0,32		0,81 ± 0,09	
Pobre	2	4,01 ± 0,27		0,78 ± 0,05	

Tabla 11. Asociación entre LTMT superiores a 3,84 Kb y estadio de Dukes tumoral. *Longitud telomérica media tumoral.

VARIABLE	N (LTMT* > 3,84 KB)	P Y PR. ESTADÍSTICA
Dukes A	2	P = 0,048
Dukes B, C y D	23	χ^2 de Pearson

En cuanto a la LTM no tumoral, se observaron diferencias significativas respecto a la recidiva ($P = 0,024$; U de Mann-Whitney); los tumores que recidivaron durante el tiempo de seguimiento mostraron una menor LTM ($3,79 \pm 0,53$ Kb) que los que no lo hicieron ($5,63 \pm 0,31$ Kb). También se encontró una diferencia con tendencia a la significación estadística en la LTM no tumoral en estadios A y B de Dukes frente a los estadios C y D ($P = 0,108$; U de Mann-Whitney).

3.1.b Estatus telomérico y su relación con el IMC

Para realizar este análisis se consideraron 47 pacientes, los cuales fueron agrupados según su IMC en tres categorías: normopeso (31,9%), sobrepeso (44,7%) y obesidad (23,4%) (**Tabla 12**). Para estos grupos se evaluó la LTM no tumoral, la LTMT (datos recogidos también en la **Tabla 12**) y el ratio T/N (datos no mostrados).

Tabla 12. Asociación entre el estatus telomérico y el IMC de pacientes afectados de CCR.; ¹Longitud telomérica media no tumoral; ²Longitud telomérica media tumoral; [#]Error estándar de la media; 1: Normopeso; 2: Sobrepeso; 3: Obesidad; *Normopeso vs Resto (sobrepeso y obesidad).

VARIABLE	N	LTMNT ¹ (KB) (MEDIA ± EE [#])	P Y PR. ESTADÍSTICA	LTMT ² (KB) (MEDIA ± EE [#])	P Y PR. ESTADÍSTICA
IMC	47	5,56 ± 0,31		3,80 ± 0,21	
1	15	4,91 ± 0,41	P = 0,049 Kruskal-Wallis	3,55 ± 0,31	P = 0,559 ANOVA de un factor
2	21	6,25 ± 0,56		3,78 ± 0,32	
3	11	5,14 ± 0,49		4,17 ± 0,52	
IMC N vs R*	47	5,56 ± 0,31	P = 0,038	3,80 ± 0,21	
1	15	4,91 ± 0,41	U de Mann- Whitney	3,55 ± 0,31	P = 0,419 T de Student
2, 3	32	5,87 ± 0,41		3,92 ± 0,27	

Estos resultados mostraron una relación significativa entre la LTM no tumoral y el IMC (P = 0,049; Kruskal-Wallis), así como diferencias significativas entre la LTM no tumoral de pacientes con normopeso (4,91 ± 0,41 Kb) respecto al grupo formado por los paciente con sobrepeso u obesidad (5,87 ± 0,41 Kb) (P = 0,038; U de Mann Whitney). Por el contrario, no se encontraron relaciones significativas entre la LTMT o el ratio T/N y el IMC.

3.1.c. Estatus telomérico y su relación con la actividad telomerasa.

En el tejido tumoral, la actividad telomerasa resultó positiva en 48 muestras (85,7%) y negativa en 8 (14,3%), sin hallarse diferencias estadísticamente significativas para la LTMT entre ambos subgrupos (P = 0,493; prueba T de Student) (**Tabla 13**). Sin embargo, cabe destacar que la LTM en los tumores telomerasa positiva fue menor (3,75 ± 0,19 Kb) que en los tumores con actividad telomerasa negativa (4,11 ± 0,54 Kb).

Tabla 13. Actividad telomerasa y su relación con la LTMT en pacientes con CCR. *Longitud telomérica media tumoral; [#]Error estándar de la media.

VARIABLE	N	LTMT* (KB) (MEDIA ± EE [#])	P Y PR. ESTADÍSTICA
Actividad Telomerasa	56	3,80 ± 0,63	
Positiva	48	3,75 ± 0,19	P = 0,493 t de Student
Negativa	8	4,11 ± 0,54	

3.1.d. Estudios de pronóstico basados en el estatus telomérico

Se analizó el papel que tiene el estatus telomérico como posible biomarcador pronóstico para pacientes con CCR que han sido sometidos a cirugía de intención curativa. En este estudio se incluyó a 49 pacientes

considerando el acortamiento de las secuencias teloméricas tumorales

(determinado como ratio T/N). Los resultados obtenidos muestran dos grupos de pacientes con diferente pronóstico clínico (P = 0,058; Log-Rank) (**Figura 3**).

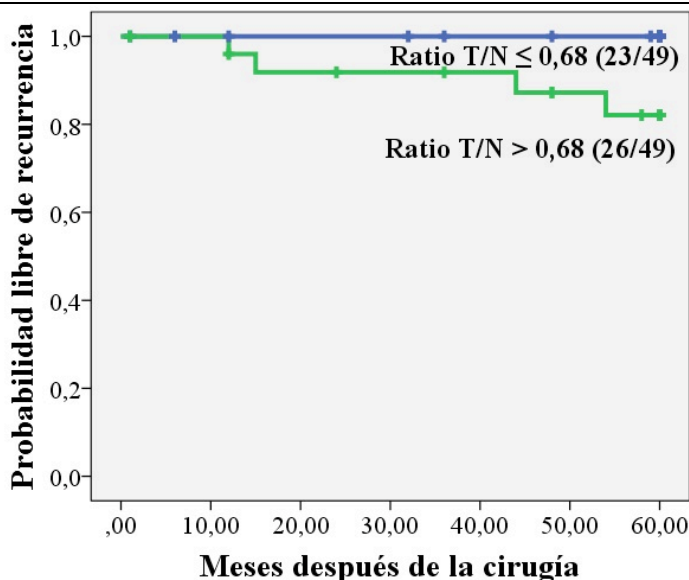


Figura 3. Curvas de supervivencia considerando el ratio T/N para pacientes con CCR.

Según estas curvas de supervivencia, los pacientes con un acortamiento de la LTMT superior al 30%, aproximadamente, presentan un pronóstico clínico más favorable, con diferencias al borde de la significación estadística.

3.1.e. Expresión de SIRT1 y SIRT6 y su relación con las variables clínico-patológicas

La expresión génica relativa media de SIRT1 y SIRT6 (media RQ ± error estándar) en el grupo de pacientes con

CCR fue de $0,54 \pm 0,6$ y de $0,30 \pm 0,4$, respectivamente. Se observó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión relativa (RQ) de SIRT1 y SIRT6 ($P = 0,038$; correlación de Pearson).

Al relacionar la expresión de estas moléculas con las variables clínico-patológicas de los tumores, los resultados obtenidos no mostraron asociaciones estadísticamente significativas (**Tabla 14**):

Tabla 14. Asociación entre la expresión de SIRT1 y SIRT6 y las variables clínico-patológicas en CCR. #Error estándar de la media; * Grado diferenciación; ** No se obtuvo el error estándar por ser N = 1.

VARIABLE	N	RQ SIRT1 (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA	N	RQ SIRT6 (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA
Dukes	50	0,55 ± 0,06	P = 0,611	51	0,31 ± 0,04	P = 0,647
A	10	0,76 ± 0,23	U de Mann-Whitney	11	0,27 ± 0,09	U de Mann-Whitney
B, C, D	40	0,50 ± 0,05		40	0,32 ± 0,05	
T	51	0,54 ± 0,06	P = 0,207	52	0,29 ± 0,04	P = 0,703
T1	2	1,42 ± 0,94	U de Mann-Whitney	2	0,2 ± 0,14	U de Mann-Whitney
T2, T3, T4	49	0,50 ± 0,05		50	0,29 ± 0,04	
N	50	0,54 ± 0,06	P = 0,857	51	0,29 ± 0,04	P = 0,385
N0	35	0,56 ± 0,08	U de Mann-Whitney	35	0,28 ± 0,05	U de Mann-Whitney
N1, N2	15	0,49 ± 0,07		15	0,31 ± 0,05	Whitney
Recidiva	49	0,52 ± 0,05	P = 0,258	50	0,32 ± 0,04	P = 0,971
No	45	0,54 ± 0,05	U de Mann-Whitney	46	0,32 ± 0,04	U de Mann-Whitney
Sí	4	0,3 ± 0,09		4	0,31 ± 0,14	Whitney
G.D*	21	0,63 ± 0,08		22	0,27 ± 0,05	
Bien	9	0,61 ± 0,1	P = 0,938	9	0,36 ± 0,09	P = 0,351
Moderado	11	0,63 ± 0,13	Kruskal-Wallis	12	0,22 ± 0,05	Kruskal-Wallis
Pobre	1	0,74 ± **		1	0,07 ± **	

3.1.f. Expresión de SIRT1 y SIRT6 en tumores colorrectales y su relación con el IMC

Al igual que en los análisis relativos al estatus telomérico, los pacientes se clasificaron según su IMC en normopeso (37,2%), sobrepeso (44,2) y obesidad (18,6%). Posteriormente, se analizó si existían diferencias

significativas ente dichos subgrupos considerando los valores de RQ obtenidos para *SIRT1* y *SIRT6* (Tabla 15), no encontrándose asociaciones significativas entre la expresión relativa de ambos genes y el IMC.

Tabla 15. Asociación entre la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* y el IMC de pacientes afectados de CCR. #Error estándar de la media; 1: Normopeso; 2: Sobrepeso; 3: Obesidad; *Normopeso vs Resto (sobrepeso y obesidad).

VARIABLE	N	RQ <i>SIRT1</i> (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA	N	RQ <i>SIRT6</i> (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA
IMC	46	0,56 ± 0,07		47	0,31 ± 0,04	
1	16	0,55 ± 0,10	P = 0,997	16	0,41 ± 0,09	P = 0,432
2	20	0,61 ± 0,13	Kruskal-Wallis	20	0,26 ± 0,6	Kruskal-Wallis
3	10	0,48 ± 0,06		11	0,26 ± 0,05	
IMC N vs *	46	0,56 ± 0,07	P = 0,982	47	0,31 ± 0,04	P = 0,252
1	16	0,55 ± 0,10	U de Mann-	16	0,41 ± 0,09	U de Mann-
2 y 3	30	0,57 ± 0,09	Whitney	31	0,26 ± 0,04	Whitney

3.1.f Expresión de *SIRT1* y *SIRT6* y su relación con la función telomérica

El acortamiento telomérico tumoral se asoció significativamente con la expresión de *SIRT1*. Concretamente, los tumores con ratio T/N ≤ 0,68 mostraron mayores niveles de expresión de *SIRT1* (P =

0,052; U de Mann-Whitney) (Figura 4). Para *SIRT6* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco se detectaron diferencias relevantes en la expresión relativa de ambos genes en función de la actividad telomerasa (Tabla 16).

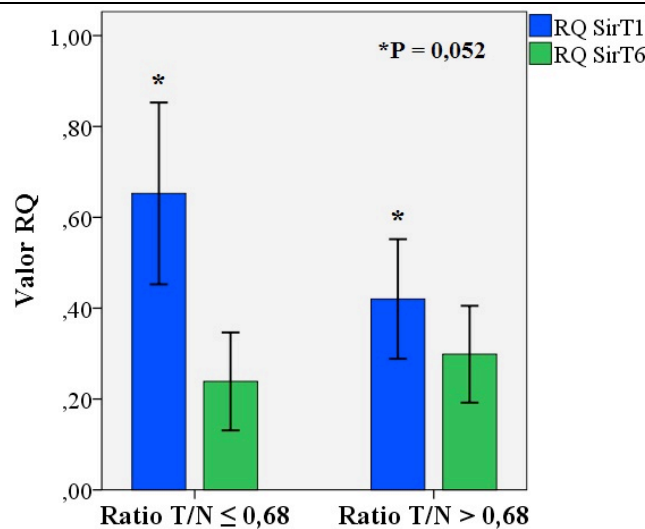


Figura 4. Asociación entre acortamiento telomérico y niveles de expresión de *SIRT1* y *SIRT6*. *Diferencias al borde de la significación estadística.

Tabla 16. Asociación entre la actividad telomerasa y la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en tumores colorrectales. #Error estándar de la media; *Actividad telomerasa.

VARIABLE	N	RQ <i>SIRT1</i> (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA	N	RQ <i>SIRT6</i> (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA
Act. Tel.*	54	0,54 ± 0,06	P = 0,417	55	0,30 ± 0,04	P = 0,578
Positiva	47	0,53 ± 0,07	U de Mann-	48	0,30 ± 0,04	U de Mann-
Negativa	7	0,59 ± 0,10	Whitney	7	0,28 ± 0,14	Whitney

3.1.g Estudios de pronóstico basados en la expresión de *SIRT1* y *SIRT6*

El análisis de la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en tumores de pacientes con CCR y sometidos a cirugía de intención curativa también se realizó para conocer su relevancia como marcador pronóstico. Para *SIRT1*, se detectaron dos grupos de sujetos con diferente pronóstico clínico. Así, los pacientes con niveles de expresión de *SIRT1* inferiores al rango considerado como normal (RQ < 0,5) mostraron un pronóstico clínico significativamente más adverso (P = 0,047; Log-Rank) (Figura 5). Dichas diferencias se mantuvieron independientemente del estadio

tumoral considerado. En las Figuras 6A y 6B se muestran las curvas de supervivencia respecto a la expresión de *SIRT1* para pacientes con CCR en estadios C y D, respectivamente. El punto de corte óptimo dividió la población en dos subgrupos con diferente pronóstico clínico, donde aquellos con una expresión relativa superior a 0,5 tenían un mejor pronóstico que aquellos con RQ < 0,5 (P = 0,065; Log-Rank).

Para *SIRT6*, no se encontró ningún punto de corte que dividiese la población en dos grupos de manera significativa.

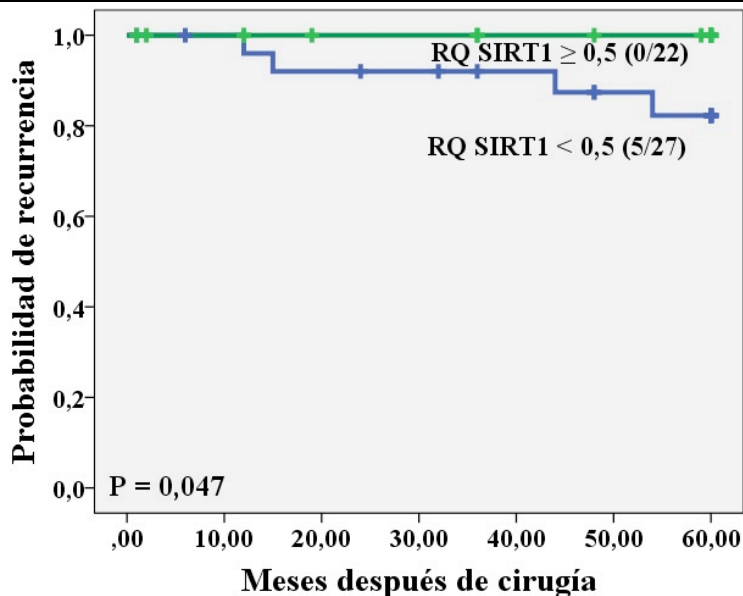


Figura 5. Curvas de supervivencia considerando el nivel de expresión de *SIRT1* en pacientes con CCR.

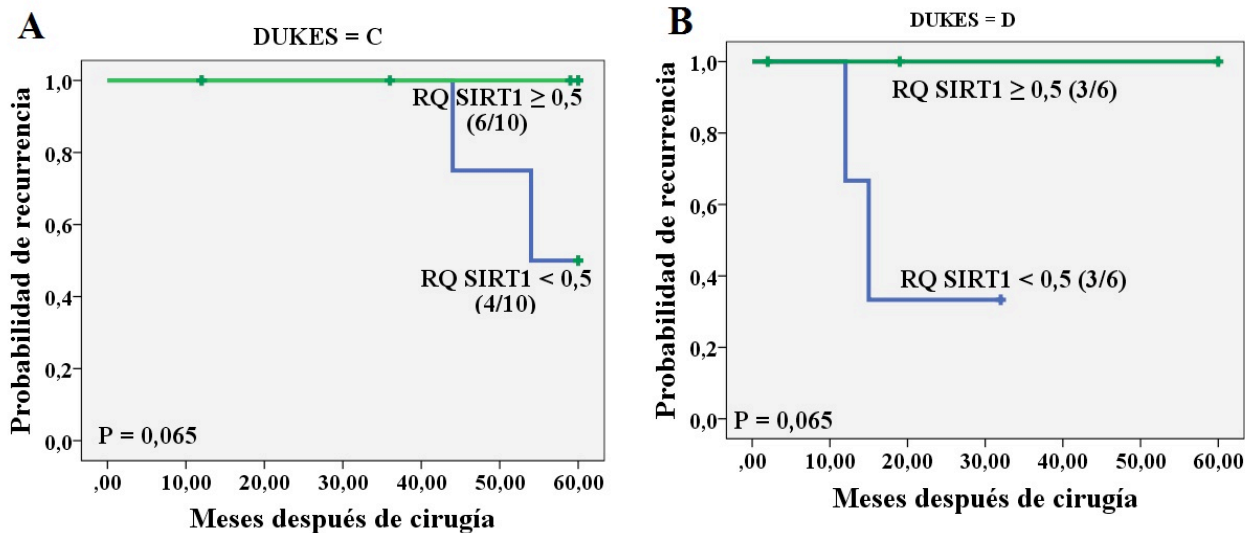


Figura 6. Curvas de supervivencia considerando el nivel de expresión de *SIRT1* en pacientes con CCR en estadio de Dukes C (A) y en pacientes con CCR en estadio de Dukes D (B).

3.2. Análisis en tejidos adiposos omental y subcutáneo

3.2.a. Relación entre la longitud telomérica relativa (LTR) en tejido adiposo y CCR

Para este estudio se analizaron las longitudes teloméricas relativas (LTR) de las muestras de tejidos adiposos omental (O) y subcutáneo (SC) de los pacientes del grupo 2 (obesos y no obesos afectados de CCR) y del grupo 3 (obesos sin CCR).

En pacientes obesos sin CCR, la LTR en tejido adiposo omental tuvo un valor superior que en pacientes obesos

con CCR, las diferencias registradas se aproximaron a la significación estadística ($P = 0,056$; U de Mann-Whitney). En tejido adiposo subcutáneo, los pacientes obesos no afectados de CCR también mostraron una mayor LTR ($P = 0,065$; U de Mann-Whitney) (**Tabla 17**).

Al comparar las LTR entre pacientes obesos con CCR y pacientes no obesos con CCR, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 18**).

Tabla 17. LTR en los tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos con CCR y de pacientes obesos sin CCR. #Error estándar de la media.

VARIABLE	PACIENTES OBESOS SIN CCR	PACIENTES OBESOS CON CCR	P Y PR. ESTADÍSTICA
Ratio T/S Omental (media \pm EE [#])	1,31 \pm 0,09	1,08 \pm 0,17	P = 0,056 U de Mann-Whitney
Ratio T/S Subcutáneo (media \pm EE [#])	1,26 \pm 0,12	1,21 \pm 0,20	P = 0,065 U de Mann-Whitney

Tabla 18. LTR en los tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes no obesos con CCR y de pacientes obesos con CCR. #Error estándar de la media.

VARIABLE	PACIENTES NO OBESOS CON CCR	PACIENTES OBESOS CON CCR	P Y PR. ESTADÍSTICA
Ratio T/S Omental (media \pm EE [#])	1,17 \pm 0,16	1,08 \pm 0,17	P = 0,293 U de Mann-Whitney
Ratio T/S Subcutáneo (media \pm EE [#])	1,22 \pm 0,10	1,21 \pm 0,20	P = 0,542 U de Mann-Whitney

3.2.b. Actividad telomerasa en tejidos adiposos.

La actividad telomerasa se determinó en los tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos afectados de CCR, siendo comparada con los pacientes no obesos con CCR (**Tabla 19**) y con pacientes obesos sin CCR (**Tabla 20**). Respecto a los dos grupos control, en pacientes obesos con CCR, el tejido adiposo omental

reflejó un mayor número de casos con actividad telomerasa positiva, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Para el tejido adiposo subcutáneo, solamente se encontraron diferencias significativas en el número de casos con actividad telomerasa positiva entre los grupos de pacientes obesos con CCR y pacientes obesos sin CCR.

Tabla 19. Actividad telomerasa en tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos con CCR y pacientes no obesos con CCR. *Tejido adiposo.

VARIABLE	ACTIVIDAD TELOMERASA	PACIENTES OBESOS CON CCR	PACIENTES NO OBESOS CON CCR	P Y PR. ESTADÍSTICA
T.A.* omental	Positiva	9	21	P < 0,001 χ^2 de Pearson
	Negativa	11	35	
T.A.* subcutáneo	Positiva	9	21	P = 0,136 χ^2 de Pearson
	Negativa	12	34	

Tabla 20. Actividad telomerasa en tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos con CCR y pacientes obesos sin CCR. *Tejido adiposo.

VARIABLE	ACTIVIDAD TELOMERASA	PACIENTES OBESOS CON CCR	PACIENTES OBESOS SIN CCR	P Y PR. ESTADÍSTICA
T.A.* omental	Positiva	9	6	P < 0,001 χ^2 de Pearson
	Negativa	11	70	
T.A.* subcutáneo	Positiva	9	6	P < 0,001 χ^2 de Pearson
	Negativa	12	70	

3.2.c Expresión de SIRT1 y SIRT6 en tejidos adiposos omental y subcutáneo

Otro de los análisis realizados consistió en evaluar la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6*, tanto en tejido adiposo omental como subcutáneo, en pacientes obesos con CCR, con objeto de investigar posibles diferencias de expresión ocasionadas por la obesidad y/o por el CCR (como control en el primer caso se consideró el grupo de pacientes no obesos con CCR y, en el segundo caso, el grupo de pacientes obesos sin CCR).

Los resultados indicaron que ambas sirtuinas muestran mayores niveles de expresión génica en los dos tipos de

tejidos analizados en pacientes obesos con CCR, con respecto a los niveles de expresión en pacientes obesos sin CCR (**Tabla 21**). Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron valores de $RQ \geq 2$. Así mismo, al comparar la expresión de las dos sirtuinas investigadas en tejidos adiposos de pacientes obesos con CCR, en relación a pacientes no obesos con CCR, ambas sirtuinas mostraron una sobreexpresión en tejido adiposo omental; *SIRT1* mostró una expresión reducida en tejido adiposo subcutáneo, aunque en ambos casos los valores de RQ se encuentran entre 0,5 y 2 (**Tabla 22**).

Tabla 21. Expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en tejidos adiposos omental y subcutáneo en pacientes obesos con CCR (control: pacientes obesos sin CCR). *Tejido adiposo.

PACIENTES OBESOS CON CCR		
VARIABLE	RQ <i>SIRT1</i> (media \pm EE)	RQ <i>SIRT6</i> (media \pm EE)
T. A.* omental	1,53 \pm 0,41	1,81 \pm 0,55
T. A.* subcutáneo	1,32 \pm 0,19	1,36 \pm 0,27

Tabla 22. Expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en tejidos adiposo omental y subcutáneo en pacientes obesos con CCR (control: pacientes no obesos con CCR). *Tejido adiposo

PACIENTES OBESOS CON CCR		
VARIABLE	RQ <i>SIRT1</i> (media \pm EE)	RQ <i>SIRT6</i> (media \pm EE)
T. A.* omental	1,24 \pm 0,33	1,66 \pm 0,51
T. A.* subcutáneo	0,85 \pm 0,12	1,03 \pm 0,20

4. DISCUSIÓN

Los telómeros tienen un papel crucial en la estabilidad genómica y en el potencial replicativo de las células, estando su disfunción relacionada con procesos oncogénicos (18). Por ello, la caracterización del estatus telomérico en los cánceres humanos, entre ellos en el CCR, ha sido investigada en estudios previos, correlacionándose con los estadios de Dukes o determinando su utilidad como posible factor pronóstico

(19). En este trabajo se ha investigado el estatus telomérico en pacientes obesos con CCR, así como en grupos control, analizándose tejidos tumorales y no tumorales, y tejidos adiposos omental y subcutáneo, y su posible relación con variables clínico-patológicas y con el pronóstico clínico.

En la serie de pacientes con CCR, las muestras tumorales presentaron un acortamiento significativo en su LTM respecto a sus controles no tumorales. Resultados

similares han sido obtenidos por otros grupos previamente (20-22). En las primeras fases de la tumorigénesis, en la mayoría de cánceres, los telómeros acortados provocan inestabilidad cromosómica y alteraciones genéticas relacionadas con la transformación celular. Posteriormente, las células tumorales estabilizan sus telómeros, evitando así que una excesiva inestabilidad genómica les provoque la muerte (23).

En relación con las variables clínico-patológicas de los tumores, se detectó una tendencia hacia una LTMT menor en estadios A de Dukes que en tumores de estadios más avanzados, hecho coincidente con otras investigaciones publicadas que asocian telómeros tumorales más largos con estadios más avanzados y peor pronóstico clínico (19, 24).

Respecto al IMC, no se encontraron asociaciones con la LTMT o el ratio T/N, aunque la LTM no tumoral fue mayor en tumores de pacientes obesos o con sobrepeso. Sin embargo, es conocido que la obesidad está relacionada con inflamación y estrés oxidativo, episodios que, en principio, deberían provocar un acortamiento de los telómeros (25). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de ahondar en la posible participación de la disfunción telomérica en la predisposición al desarrollo del tipo tumoral aquí investigado, llevando a cabo para ello el estudio en una población con un mayor número de casos.

La serie de tumores colorrectales considerada en este trabajo mostró una actividad telomerasa positiva en el 85% de las muestras. Este elevado porcentaje de actividad también se ha observado en anteriores trabajos (19, 26), puesto que en la mayoría de los tumores el mantenimiento de los telómeros se lleva a cabo por la reactivación de la telomerasa, evento crucial para la iniciación y supervivencia tumoral (2). Sin embargo, los datos obtenidos no son indicativos de la existencia de correlaciones entre la actividad de la enzima y la longitud de los telómeros, lo cual establece la necesidad de analizar con cierto detalle la función de las proteínas del complejo *sheltering*, especialmente aquellas que intervienen directamente facilitando o restringiendo el acceso de telomerasa a los extremos cromosómicos.

Nuestros resultados han permitido confirmar el valor del estatus telomérico como factor pronóstico en CCR, estableciéndose que aquellos pacientes con tumores con un acortamiento telomérico superior al 30% presentan un mejor pronóstico clínico. El papel pronóstico del estatus telomérico puede ser diferente dependiendo del tipo de tumor: en el CCR, el acortamiento de los telómeros parece tener un papel supresor tumoral ya que la disfunción telomérica activa las vías de senescencia y apoptosis (27); por el contrario, en otros tumores, como el cáncer de pulmón no microcítico, el acortamiento telomérico estaría relacionado con el incremento de la inestabilidad genómica (28).

En base a la importancia del estatus telomérico en el pronóstico de los pacientes con CCR, resulta crucial analizar el efecto que puedan tener moléculas relacionadas con la homeostasis telomérica, como son *SIRT1* y *SIRT6*.

Los datos del presente trabajo parecen indicar que el acortamiento significativo de los telómeros en cánceres colorrectales se asocia con mayores niveles de *SIRT1*. Además, los estudios de pronóstico mostraron que una reducción en la expresión de *SIRT1* disminuye la supervivencia de los pacientes. Estos resultados estarían en consonancia con investigaciones previas, que demuestran la implicación de *SIRT1* en la disminución de la proliferación celular (29). Otros trabajos han demostrado el posible papel oncogénico de *SIRT1* (30), mostrándose así el comportamiento dual que este gen tiene en el desarrollo del cáncer. En cuanto a *SIRT6*, también se ha descrito su papel dual en cáncer, pudiendo actuar como oncogen o como gen supresor tumoral (31, 32).

Otro punto de nuestro estudio es el análisis de la posible relación entre la obesidad y el CCR, para lo que se evaluó el estatus telomérico y la expresión de *SIRT1* y *SIRT6* en tejidos adiposos omental y subcutáneo. Los resultados obtenidos indicaron que, en pacientes obesos con CCR, ambos tipos de tejido adiposo tienen telómeros más acortados que en pacientes sin CCR. Los pacientes obesos con CCR tienen la actividad inmunitaria aumentada en la región tumoral, con respecto a los pacientes obesos sin cáncer, lo que genera mayores niveles de citoquinas y moléculas proinflamatorias que podrían provocar un estrés oxidativo que conduzca al acortamiento de los telómeros en los tejidos investigados (33). Sin embargo, son necesarias futuras investigaciones que ayuden a explicar estas observaciones.

Los resultados del trabajo indicaron asimismo que la actividad telomerasa es superior en tejido adiposo omental de pacientes obesos sin CCR que en el mismo tejido obtenido a partir de pacientes no obesos con CCR. También se detectó una mayor actividad en los tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos con CCR, respecto a pacientes obesos sin CCR. Esta observación estaría en consonancia con el párrafo anterior, ya que, en pacientes obesos con CCR, la inflamación y el estrés son superiores, incrementando la muerte celular. Como compensación a esta muerte, las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC en inglés) incrementarían su actividad regenerativa, para lo cual la actividad telomerasa resulta crucial (34).

Por último, la expresión de ambas sirtuinas mostró una tendencia a la sobreexpresión en pacientes obesos con CCR en comparación con los dos grupos control. Los niveles de sirtuinas, principalmente *SIRT1* y *SIRT6*, se ven reducidos en tejidos adiposos de pacientes obesos después de la pérdida de peso (35) y, como se ha indicado anteriormente, *SIRT1* y *SIRT6* tienen papeles muy controvertidos en el desarrollo del cáncer (29-32). Por ello, para poder determinar la posible función de estas moléculas en relación con el estatus telomérico, en obesidad y cáncer, sería necesario investigar un mayor número de casos y disponer de un nuevo grupo control integrado por pacientes no obesos y sin CCR.

5. CONCLUSIONES

Los tumores colorrectales acortan significativamente las secuencias teloméricas, con respecto a los tejidos no tumorales.

Los tumores colorrectales de estadio A de Dukes presentan los telómeros significativamente más cortos que los clasificados en estadios más avanzados (B-D de Dukes).

Considerando pacientes afectados de CCR, los telómeros de las células no tumorales de pacientes obesos o con sobrepeso son significativamente más largos que los de pacientes con normopeso.

Existe una clara tendencia hacia un pronóstico clínico más favorable en el grupo de pacientes con CCR, que presentan secuencias teloméricas tumorales acortadas significativamente.

En tumores colorrectales se detecta correlación entre la expresión génica de *SIRT1* y *SIRT6*.

Los tumores colorrectales con acortamiento telomérico significativo registran mayores niveles de expresión de *SIRT1*.

Los niveles de expresión disminuidos de *SIRT1* se asocian con pronóstico clínico desfavorable en CCR.

En tejido adiposo omental de pacientes obesos afectados de CCR, los telómeros presentan tamaños superiores que en el grupo control de individuos obesos sin CCR.

Considerando los dos grupos de sujetos control del presente trabajo, la actividad telomerasa se reactiva principalmente en el tejido adiposo omental de pacientes obesos con CCR.

6. LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosin difosfato
ADSC: *Adipose Derived Stem Cells*
ALT: *Alternative Lengthening of Telomeres*
AUE: Agua Ultra Estéril
CCR: Cáncer Colorrectal
cDNA: *complementary DNA*
Ct: *Cycle threshold*
DDR: *DNA Damage Responsive*
DNA: *Deoxyribonucleic acid*
E: Eficiencia
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
HCSC: Hospital Clínico San Carlos
hTERC: *human Telomerase RNA gen*
hTERT: *human Telomerase Reverse Transcriptase*
IMC: Índice de Masa Corporal
Kb: Kilobases
LT: Longitud Telomérica
LTM: Longitud telomérica media
LTMT: Longitud telomérica media tumoral
LTR: Longitud telomérica relativa
NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

ncRNA: *non-coding RNA*

NTP: *Nucleoside diphosphates*

O: Omental

OD: *Optical Density*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

POT1: *Protection Of Telomeres 1*

qRT-PCR: *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*

RAP1: *Ras-related Protein 1*

Ratio T/N: Ratio tumoral/no tumoral

RNA: *Ribonucleic acid*

RPLPO: *gen Large Ribosome Protein*

RQ: *Relative Quantification*

S: Gen de copia única

SC: Subcutáneo

SIRT: Sirtuina

T: Secuencia telomérica

TEL: gen Telómeros

TERRA: *Telomeric Repeat-containing RNA*

TNM: *Primary tumor T, Nodal involvement N, distant Metastasis M*

TPE: *Telomere Position Effect*

TRF: *Telomere Restriction Fragment*

7. CONFLICTO DE INTERESES

No existe conflicto de intereses.

8. REFERENCIAS

1. Chan SRWL, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *R. Soc. Lond.* 2003; 359:109-121.
2. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* 2016; 8(1): 1-18.
3. Samassekou O, Gadji M, Drouin R, Yan J. Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Ann Anat.* 2010; 192(5):284-291.
4. Ligner J, Cooper JP, Cech TR. Telomerase and DNA End Replication: No longer a Lagging Strand Problem? *Science.* 1995; 269(5230):1533-4.
5. Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B, Melander O, Nilsson P, Roos G. Telomere Length Is Associated With Obesity Parameters but With a Gender Difference. *Obesity.* 2008; 16 (12): 2582-2689.
6. Ungefroren H, Gieseler F, Flidner S, Lehnert H. Obesity and Cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015; 21(1):5-15.
7. Blasco MA. Telomeres and human disease: aging, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005; 6:611-22.
8. Martínez AR, Kaul Z, Parvin JD, Groden J. Differential requirements for DNA repair proteins in immortalized cell lines using alternative lengthening of telomere mechanisms. *Genes Chromosomes Cancer.* 2017; 56:617-31.
9. Ogrunc M, d'Adda di Fagagna F. Never-ageing cellular

- senescence. *Eur J Cancer*. 2011; 47(11):1616-22.
10. Bosch-Presegué L, Vaquero A. The Dual role of Sirtuins in Cancer. *Genes Cancer*. 2011; 2(6):648-62.
 11. Yao H, Rahman I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of SIRT1 in inflammaging and senescence. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84:1332-9.
 12. Carafa V, Nebbioso A, Altucci L. Sirtuins and disease: the road ahead. *Front Pharmacol*. 2012; 3(4):1-6.
 13. Lakowa N, Trieu N, Flehmig G, Lohmann T, Schön MR, Dietrich A, Zeplin PH, Langer S, Stumvoll M, Blüher M, Klötting N. Telomere length differences between subcutaneous and visceral adipose tissue in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 457(3):426-32.
 14. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*. 1976; 3(9):2303-8.
 15. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):2002-7.
 16. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266(5193):2011-15.
 17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-9.
 18. Bertorelle R, Rampazzo E, Pucciarelli S, Nitti D, De Rossi A. Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(8):1940-50.
 19. Fernández-Marcelo T, Sánchez-Pernaute A, Pascua I, De Juan C, Head J, Torres-García AJ, Iniesta P. Clinical relevance of telomere status and telomerase activity in colorectal cancer. *PLoS One*. 2016; 11(2):1-12.
 20. García-Aranda C1, de Juan C, Díaz-López A, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Díaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M, Iniesta P. Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2006; 106(3).
 21. Haghghi MM, Aghagolzadeh P, Zadeh SM, Molaei M, Zali MR, Radpour R. Telomere shortening: a biological marker of sporadic colorectal cancer with normal expression of p53 and mismatch repair proteins. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014; 18(4):236-44.
 22. Feng TB, Cai LM, Qian KQ, Qi CJ. Reduced telomere length in colorectal carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(2):443-6.
 23. Zhao Z, Pan X, Liu L, Liu N. Telomere length maintenance, shortening, and lengthening. *J Cell Physiol*. 2014; 229(10):1323-29.
 24. Jia H, Wang Z. Telomere Length as a Prognostic Factor for Overall Survival in Colorectal Cancer Patients. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 38(1):122-28.
 25. Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, Reus VI, Rosser R, Burke HM, Kupferman E, Compagnone M, Nelson JC, Blackburn EH. Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress--preliminary findings. *PLoS One*. 2011; 6(3):e17837.
 26. Sanz-Casla MT, Vidaurreta M, Sánchez-Rueda D, Maestro ML, Arroyo M, Cerdán FJ. Telomerase activity as a prognostic factor in colorectal cancer. *Onkologie*. 2005; 28(11): 553-7.
 27. Fernández-Marcelo T, Morán A, de Juan C, Pascua I, Head J, Gómez A, Hernando F, López-Asenjo JA, Hernández S, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Benito M, Iniesta P. Differential expression of senescence and cell death factors in non-small cell lung and colorectal tumors showing telomere attrition. *Oncology*. 2012; 82(3):153-64.
 28. Fernández-Marcelo T, Gómez A, Pascua I, de Juan C, Head J, Hernando F, Jarabo JR, Calatayud J, Torres-García AJ, Iniesta P. Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015; 34(1):1-7.
 29. Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, Zhang X, Wang C, Yeatman T, Coppola D, Chen J. SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer. *J Biol Chem*. 2009; 284(27):18210-17.
 30. Grbesa I, Pajares MJ, Martínez-Terroba E, Agorreta J, Mikecin AM, Larráyoiz M, Idoate MA, Gall-Troselj K, Pio R, Montuenga LM. Expression of sirtuin 1 and 2 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0124670.
 31. Feng XX, Luo J, Liu M, Yan W, Zhou ZZ, Xia YJ, Tu W, Li PY, Feng ZH, Tian DA. Sirtuin 6 promotes transforming growth factor- β 1/H2O2/HOCl-mediated enhancement of hepatocellular carcinoma cell tumorigenicity by suppressing cellular senescence. *Cancer Sci*. 2015; 106(5): 559-66.
 32. Sebastián C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, Ram O, Truelove J, Guimaraes AR, Toiber D, Cosentino C, Greenson JK, MacDonald AI, McGlynn L, Maxwell F, Edwards J, Giacosa S, Guccione E, Weissleder R, Bernstein BE, Regev A, Shiels PG, Lombard DB, Mostoslavsky R. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell*. 2012; 151(6):1185-9.
 33. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol*. 2013; 14(6):218-28.
 34. Blázquez-Martínez A, Chiesa M, Arnalich F, Fernández-Delgado J, Nistal M, De Miguel MP. c-Kit identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells

Telomere function and sirtuins 1 and 6 in colorectal cancer from obese and non-obese patients. Clinical correlations

in adipose tissue with higher telomerase expression and differentiation potential. Differentiation. 2014; 87(3-4): 147-60.

35. Moschen AR, Weiser V, Gerner RR, Bichler A, Enrich B, Moser P, Ebenbichler CF, Kaser S, Tilg H. Adipose tissue and liver expression of SIRT1, 3, and 6 increase after extensive weight loss in morbid obesity. J Hepatol. 2013; 59(6):1315-22.



New pharmaceutical formulations from nanotechnology for cancer treatment based on gene therapy strategies

Title in Spanish: *Nuevas formulaciones farmacéuticas basadas en la nanotecnología dirigidas al tratamiento del cáncer mediante estrategias de terapia génica*

Mercedes Fructuoso¹, Laura Blanco¹, Conchita Tros de Ilarduya^{1,*}

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra. C/ Irunlarrea s/n, 31080 Pamplona.

ABSTRACT: In this project we have characterized and evaluated the *in vitro* and *in vivo* transfection efficiency of lipid/DNA (lipoplexes) and PEI 25/DNA (poliplexes), formed with the ligands transferrin and asialofetuin, and the peptide protamine. Both types of complexes were characterized showing an homogeneous particle size in the nanometer range and positive surface charge. It has been shown a good transfection efficiency of transferrin and asialofetuin formulations, and in all cases transfection further increased in the presence of ligands with protamine. In HepG2 cells (human hepatoblastoma) we have obtained the best transfection efficiency with both lipoplexes and polyplexes in the presence of asialofetuin with protamine. In HeLa cells (human cervix-uterine carcinoma) and CT-26 (murine colon carcinoma) the best results were obtained in the presence of transferrin with protamine. The toxicity of lipoplexes was much lower than polyplexes both *in vitro* and *in vivo*. After 24 hours of intravenous injection of lipoplexes, gene expression led us to specific transfection in the lung with the transferrin-protamine formulation, and in the liver in the case of the administration of asialofetuin-protamine complexes. The good transfection efficiency and high viability *in vitro* and *in vivo* indicates that lipoplexes could be an interesting alternative to viral vectors in the treatment of some diseases through gene therapy strategies.

RESUMEN: La acción terapéutica de un gen vehiculizado en diferentes formulaciones galénicas depende de forma relevante de su correcta liberación desde la forma farmacéutica y de su correcta llegada al lugar de acción. Por ello, un adecuado diseño de este tipo de formulaciones constituye un factor decisivo en la investigación farmacéutica. Las formulaciones preparadas en este trabajo han sido diseñadas con el fin de ser aplicadas a la terapia de una enfermedad de gran relevancia, como es el cáncer. La liberación de genes terapéuticos vehiculizados en estas nuevas formulaciones farmacéuticas se presenta como una prometedora alternativa en el tratamiento de esta enfermedad. Las formulaciones estudiadas reducen considerablemente el tamaño del DNA y su carga final positiva favorece la entrada en la célula por endocitosis. Son formulaciones estables, fáciles de preparar (incluso a gran escala), presentan una morfología homogénea y condensan el DNA de manera eficaz. Las formulaciones desarrolladas son capaces de proteger el material genético de la degradación por las nucleasas presentes en el suero. Por otra parte, se ha demostrado que las nuevas formulaciones son capaces de transferir material genético a las células tumorales de hepatocarcinoma humano, carcinoma de cérvix y de cáncer de colon murino. Se debe también tener en cuenta que, en ocasiones, muchos de los vectores que presentan una alta eficacia de transferencia de genes también poseen una alta toxicidad y/o inmunogenicidad, como sería el caso de los sistemas basados en virus. Frente a esto, otra ventaja importante de estos sistemas es su baja citotoxicidad.

*Corresponding Author: ctros@unav.es

Received: March 6, 2018 Accepted: March 19, 2018

Premio CINFA en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 1 (2018), pp. 72-85

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto de terapia génica

La terapia génica es la administración de ácidos nucleicos con fines terapéuticos. Supone el tratamiento de una enfermedad mediante la transmisión de material génico a células específicas de un paciente con el fin de

corregir, activar o generar una nueva actividad, proporcionando una terapia alternativa a los fármacos convencionales para el tratamiento de enfermedades genéticas hereditarias, adquiridas, infecciosas o metabólicas. Podemos diferenciar dos tipos de terapia génica según las células sobre las que se actúe.

La terapia génica **somática** consiste en la inserción de

genes funcionales ausentes en el individuo. Se realiza en todas las células y tejidos del organismo con el objetivo de tratar una enfermedad o realizar un marcaje, de manera que las modificaciones introducidas, si consiguen perdurar en la célula, no son heredables y solo tienen lugar en dicho paciente.

La terapia génica **germinal**, por otro lado, provoca que la expresión génica del material genético administrado se mantenga en los descendientes. Actualmente existen muchos conflictos éticos y jurídicos con este tipo de terapia génica en líneas celulares germinales, por lo que no está permitida.

Las formas de administración que existen en terapia génica son las terapias *in vivo* y *ex vivo*. La que mejores resultados obtiene es la terapia *ex vivo*, que consiste en la extracción de una muestra del paciente, su tratamiento, y posterior reimplantación. Aun así, es la alternativa más costosa y presenta un alto riesgo de contaminación tanto de la formulación como de las células en cultivo. Sin embargo, la terapia *in vivo* permite la administración directa de la formulación con un coste menor y disminuyendo el riesgo de inmunogenicidad.

Existen gran cantidad de enfermedades que se pueden tratar con terapia génica. Algunas de ellas son enfermedades metabólicas como el cáncer, inmunodeficiencias, hemofilias, hipercolesterolemia familiar, etc., o enfermedades infecciosas como el SIDA. El cáncer es una de las enfermedades más estudiadas en el campo de la biomedicina. Las diferentes alternativas de las que se disponen hoy en día a la hora de combatir esta enfermedad incluyen la inactivación de oncogenes, la administración de genes supresores de tumores, las terapias suicidas, inmunoterapias génicas, terapias génicas antiangiogénicas y las basadas en telomerasa entre otros tipos. Aunque todavía en desarrollo, estas técnicas, sobre todo en combinación con otras terapias más convencionales, como la quimio o radioterapia, prometen ser eficaces en un futuro próximo, ya que su diversidad y sobre todo su especificidad permiten una precisión respecto al tumor en tratamiento que no alcanzan otras terapias antitumorales.

1.2. Vectores en terapia génica

Uno de los procesos más importantes en terapia génica es la introducción del gen terapéutico en la célula diana, de forma que se alcance el núcleo. Es importante tener en cuenta, que la entrada de ADN exógeno desencadena una respuesta inmunológica que puede generar procesos inflamatorios y activar la inmunidad humoral y celular. Desde hace tiempo se dispone de diversos métodos para introducir material genético en células eucarióticas, pero algunos como la electroporación, no son adecuados para la terapia génica, debido a la gran mortalidad que producen en las células o a la dificultad que implica su aplicación *in vivo*. Los métodos más eficientes y apropiados son los que se basan en el uso de vectores, elementos capaces de transportar el material genético dentro de sí y ser captados por la célula, de forma que el material aportado pase al

interior de ésta. Actualmente los tipos de vectores empleados en terapia génica son virales o no virales (1,2).

1.2.a. Vectores virales

Los vectores virales se basan en virus que han sufrido modificaciones. Se elimina del virus su capacidad de replicación y todo efecto patogénico en su estado natural, sin afectar a su capacidad de infectar la célula huésped e introducir en ella el material genético que contienen. Aunque los vectores virales han demostrado una gran capacidad de transferencia génica, son deficientes en otras áreas igual de imprescindibles. Por ejemplo, los vectores adenovirales inducen respuestas inflamatorias e inmunológicas, por lo que son rechazados en cuanto a la utilización en el caso de administraciones repetidas. El empleo de vectores no virales evita este tipo de problemas, por lo que la búsqueda actual de vectores no basados en virus se ha potenciado (1).

1.2.b. Vectores no virales

Son compuestos capaces de formar complejos con el ADN y unirse a la membrana celular para depositarlo dentro de la célula. La formulación no viral debe tener presente los obstáculos que aparecen en las sucesivas etapas que intervienen entre el exterior de la célula diana y el núcleo de ésta. Los problemas a tener en cuenta son entre otros: compactación del material genético y su defensa ante agentes mecánicos y enzimáticos extracelulares, asociación del material genético a la superficie celular para facilitar su entrada, transfección del material genético exógeno en el núcleo y su integración en el genoma celular, y finalmente un factor a superar muy importante, el transporte por la sangre. La transfección con un vector no viral se ve limitada por el suero de la sangre que genera una interacción inespecífica y provoca una modificación de los niveles de transfección tanto en el organismo como en cultivos celulares. Los diferentes tipos de vectores no virales se han diseñado para suplir todas estas condiciones, pero también es posible que se ignore la existencia de alguna barrera más que no sea del todo eficiente o se encuentre ausente a la hora de la transferencia. Dentro de este grupo de vectores se encuentran los lípidos catiónicos, polímeros, y péptidos, con los que trabajamos en este proyecto. La contrapartida que comprende este tipo de vectores es la baja capacidad de transfección debido al gran número de barreras a superar (3), pero en cualquier caso, su buena biocompatibilidad y su potencial producción a gran escala hacen que sean la mejor apuesta. Debido a que aún no hay un vector no viral que consiga vencer las diferentes barreras que existen en el organismo y sea útil en un amplio abanico de enfermedades, se hace necesario investigar los mecanismos de transfección y diseñar nuevos sistemas de liberación de genes específicos y seguros (1).

a) Vectores lipídicos

Un buen ejemplo de vectores no virales son los vectores lipídicos. Los liposomas catiónicos pueden formar complejos con el ADN formando lipoplejos a

través de una combinación de interacciones electrostáticas. Sin embargo, estos vectores carecen de especificidad tumoral y muestran una baja eficiencia de transfección *in vivo* en comparación con los vectores virales (4). Como se ha demostrado recientemente los lipoplejos a base de lípidos catiónicos, son partículas más estables. Para su preparación se requieren compuestos que presenten, por un extremo, un grupo extremadamente polar y por el otro una pareja de ácidos grasos (por ejemplo, colesterol). Al hidratarse, estos compuestos catiónicos son capaces de formar complejos con esta molécula de naturaleza polianiónica para formar vesículas de doble membrana, con los grupos polares situados tanto en el exterior como en el interior, por donde se asocian con el ADN. La estructura de los lipoplejos facilita que al contacto del liposoma con la célula, ambas estructuras se fundan y el contenido del liposoma sea directamente vertido en el citoplasma. Dentro de los vectores no virales, los lipoplejos constituyen la alternativa más prometedora en terapia génica. Cumplen cuatro objetivos muy importantes como vectores: protección de la degradación por DNAsas y condensación del ADN; mediar en la adhesión celular al superar la polaridad generalmente negativa de la mayoría de las superficies celulares; y facilitar la localización intracitoplasmática de la molécula de ADN (5). Sin embargo, defectos en la formación del lipoplejo y la exposición del ácido nucleico pueden dar lugar a agregados y por lo tanto, a una eficiencia de transfección deficitaria.

Dada la diversidad en los posibles mecanismos de entrada, es de interés determinar si las propiedades físico-químicas de las nanopartículas definen la trayectoria de entrada. Claramente, el tamaño de partícula representa un importante parámetro que contribuye en este proceso de internalización. Es importante destacar que las nanopartículas basadas en lípidos, formuladas con ADN, tienen un diámetro comprendido entre 80-120 nm, ideal para su uso *in vivo*. Es bien sabido que ciertos péptidos como la protamina, actúan como condensadores del ADN, pudiendo disminuir el tamaño de partícula, y manteniéndolos en un rango nanométrico ideal, que parece estar directamente relacionado con la eficacia de transfección (6). Además, también contribuye a la protección frente a la degradación por DNAsas. Por otra parte, la protamina presenta señales de localización nuclear (SLN) con alto contenido de arginina que mejora la entrada de ADN al núcleo. Se ha demostrado que este alto contenido de arginina mejora los sistemas de suministro de genes virales y no virales, aunque no ha respondido favorablemente cuando se ha utilizado únicamente la arginina (7).

b) Vectores poliméricos

Entre los vectores poliméricos más utilizados, existen los basados en polietilenimina ramificada de 25 kDa. La

polietilenimina se une al ADN formando los llamados poliplejos, los cuales han sido muy utilizados ya que eran muy prometedores, al conseguir la liberación del ADN de una forma eficiente tanto *in vitro* como *in vivo* (8). Este polímero es un compuesto, que debido a la presencia en su estructura de un nitrógeno triplemente protonado le confiere una alta capacidad amortiguadora que hace que los poliplejos de PEI 25 permitan que el material genético no sea degradado por el medio ácido de los endosomas y se libere fácilmente. Dado que la eficacia de entrada y liberación intracelular puede depender del tamaño de partícula, la polidispersión de una formulación puede contribuir también a la eficiencia de entrega del material en el citoplasma, por lo que dependerá además de la naturaleza de la partícula. En concreto, la liberación de ADN a partir de los poliplejos, se puede comparar al denominado efecto de “esponja de protones”, mientras que los lipoplejos a base de lípidos catiónicos poseen mecanismos de disrupción endosomal que facilitan la liberación del ADN en el citosol tras la endocitosis (2). Otros autores han concluido que tanto la línea celular como el tipo de polímero y formulación utilizada, influyen en la expresión génica del vector administrado (8). En cuanto a la toxicidad que presentan los complejos de PEI, están implicados ciertos parámetros como el peso molecular y el grado de ramificaciones del polímero, así como el tamaño y la carga superficial de las formulaciones. Se han hecho experimentos que demuestran que estos complejos presentan alta toxicidad (9).

1.3. Direccionamiento de vectores mediante la utilización de ligandos

La mayoría de los objetivos en transferencia génica consisten en tomar como estrategia la liberación del material genético en un órgano o tejido específico (10). Existen múltiples moléculas que entran en las células a través de un proceso que comienza por la unión a receptores de membrana. La interacción ligando-receptor es específica (Figura 1). Se han hecho múltiples estudios de competición en los que se observa cómo tras el bloqueo de los receptores, dichas moléculas no entran en las células. Con el objetivo de aumentar la especificidad y la eficacia de transfección génica, durante los últimos años se ha estudiado cómo afecta la unión de determinados ligandos a la superficie de los vectores en el proceso de liberación del material genético, como por ejemplo, asialoglicoproteínas, la transferrina, el ácido fólico, la insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), entre muchos otros. Una de las estrategias perseguidas en este estudio, ha sido introducir el ADN en las células mediante un ligando y explotar la especificidad natural de una endocitosis mediada por receptor (5).

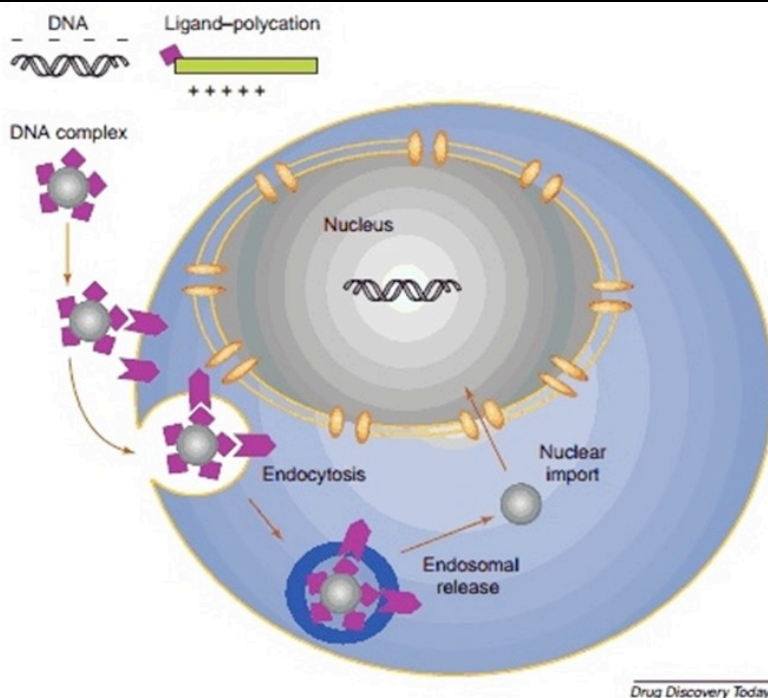


Figura 1. Transporte al interior del núcleo para acceder a la maquinaria de transcripción nuclear (13).

La transferrina es sintetizada en el sistema retículo endotelial (S.R.E.), pero principalmente en el hígado, por lo que el proceso de endocitosis mediada por receptor ha sido descrito especialmente en los hepatocitos. Los lipoplejos con transferrina han demostrado ser una prometedora estrategia de focalización (4). Existe sobreexpresión de este receptor en la superficie de las células tumorales, por lo que su utilización como ligando estaría más que justificado para obtener tratamientos más específicos. Otra estrategia ha sido la utilización de asialofetuína, una proteína que se une a las partículas mediante la unión por interacciones electrostáticas. Las fenestraciones del endotelio de los capilares del hígado son ventajosas a la hora de direccionar las partículas. Las células del parénquima (hepatocitos) tienen asialoglicoproteínas, receptores capaces de reconocer cadenas de galactosa. La asialofetuína es una molécula de glicoproteína que posee varias cadenas del azúcar galactosa, lo cual implica un reconocimiento específico entre la asialofetuína y los receptores de asialoglicoproteínas de los hepatocitos (11). Estos receptores se encuentran sobreexpresados en el caso de un hígado enfermo, por lo tanto es una estrategia interesante en el tratamiento del cáncer de hígado (6). En general, la terapia génica es una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer, que requiere de dos entidades principales, el gen terapéutico y vector responsable de su transporte y entrega en la célula diana de forma intacta. Aunque hay una variedad de vectores disponibles que muestran una eficaz transferencia genética en cultivos celulares, la entrega eficiente y la especificidad *in vivo* sigue siendo el principal objetivo a alcanzar (12).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material

2.1.a. Material génico

El ADN plasmídico (ADNp) utilizado que contiene el gen de la luciferasa bajo el promotor del citomegalovirus (CMV) pCMV-Luc (VR-1216) es de Promega Corporation (EE.UU.). Su crecimiento se llevó a cabo en *Escherichia coli* y su purificación utilizando Quiagen EndoFree® Plasmid Giga Kit (Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante, como se explica en el apartado de “métodos”.

2.1.b. Productos y reactivos

En la elaboración de los liposomas se utilizaron los lípidos catiónicos 1,2- Dioleoiloxi-3-(trimetilamonio) propano (DOTAP) de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (EE.UU.) y colesterol de Sigma-Aldrich (EE.UU.). Para la elaboración de las distintas formulaciones de lipoplejos se utilizaron los ligandos transferrina humana, de Becton Dickinson (EE.UU.), y asialofetuína y el péptido protamina, ambos de Sigma-Aldrich (EE.UU.). La cuantificación del ADNp se realizó utilizando el NanoDrop™ ND-1000 de Thermo Fisher Scientific Inc. (EE.UU.). Para formular los poliplexos se utilizó polietilimina ramificada de 25 kDa de Aldrich Chemical Company, Inc (EE.UU.). En los ensayos de viabilidad se utilizó el reactivo “Alamar Blue” de Accumed International Companies (Westlake, OH, EE.UU.).

2.1.c. Cultivos celulares

Las células HepG2 (hepatocarcinoma humano), HeLa (cáncer cérvico-uterino humano) y CT-26 (cáncer de colon

murino), utilizadas en los ensayos *in vitro*, se obtuvieron de American Type Culture Collection, MD (EE.UU.). Se mantuvieron a 37°C con un 5% de CO₂ en un incubador Forma Scientific, Inc, CO₂ Water Jacked Incubator 3121 (EE.UU.), y crecieron en DME-10, Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose con 4500 mg/L de glucosa y Glutamax-I, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Como tampón fosfato se utilizó PBS (pH 7,4, 0,15 M). Todos los productos se obtuvieron de Gibco BRL (Reino Unido).

2.2. Métodos

2.2.a. Purificación del ADNp

El plásmido utilizado en los experimentos fue el pCMV-Luc. Para su crecimiento y purificación se tomó una unidad formadora de colonias de una cepa de *Escherichia coli* modificada y se hizo crecer primero en 5 ml de precultivo LB Broth (1% p/v de triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura y 1% de NaCl) con 50 µg/ml de kanamicina durante 4 horas a 37°C y después en 2 L del mismo medio durante 12 horas a la misma temperatura y en agitación en un agitador Shaker 625, New Brunswick Scientific, Co. Inc, Edison (EE.UU). Tras la centrifugación de las bacterias a 6000 g y 4°C durante 15 minutos en una centrífuga Beckman J2-HS, la purificación se llevó a cabo con el Quiagen EndoFree® Plasmid Giga Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante hasta conseguir el plásmido, que fue resuspendido en 1 ml de agua estéril. La determinación de la pureza y concentración del plásmido se realizó utilizando el NanoDrop™ ND-1000 de Thermo Fisher Scientific Inc. (EE.UU.).

2.2.b. Preparación y caracterización físico-química de los vectores lipídicos y poliméricos

En la preparación de los poliplexos, se partió del polímero PEI 25 (10 mM) que se disolvió en agua estéril (pH 7,4, HCl 1 N), se filtró por un dispositivo Millipore 0,22 µm Corning® N414831 (Alemania) y se conservaron a 4°C hasta su utilización. Para la preparación de los liposomas, DOTAP: Colesterol (1:0,9), se partió de una solución de lípidos (5 mg/ml) en cloroformo. Tras la eliminación del disolvente a presión reducida mediante el uso de un rotavapor, el film de lípidos resultante se hidrató con tampón HEPES 10 Mm (pH 7,4) glucosado al 10% (p/v). Las vesículas resultantes se filtraron a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm de diámetro, y de dos filtros de apoyo (Avanti, Polar Lipids, Inc. (EE.UU.)). Finalmente, los liposomas se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Los complejos poliméricos para los ensayos *in vitro* se realizaron a una relación PEI 25/ADN N/P 4, añadiéndose 4 grupos protonables por cada grupo fosfato negativo del ADNp. Por otro lado, los lipoplejos, se prepararon a una relación de cargas lípido/ADN (+/-) 5/1. En total se realizaron 10 formulaciones por simple mezcla de los componentes, 5 de poliplexos y 5 de lipoplejos, que se describen a continuación:

- Formulación 1
PEI 25
- Formulación 2
PEI 25 + transferrina (32 µg/µg ADN)
- Formulación 3
PEI 25 + transferrina (32 µg/µg ADN) + protamina (0,5 µg/µg ADN)
- Formulación 4
PEI 25 + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN)
- Formulación 5
PEI 25 + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN) + protamina (0,4 µg/µg ADN)
- Formulación 6
DOTAP/Colesterol
- Formulación 7
DOTAP/Colesterol + transferrina (32 µg/µg ADN)
- Formulación 8
DOTAP/Colesterol + transferrina (32 µg/µg ADN) + protamina (0,5 µg/µg ADN)
- Formulación 9
DOTAP/Colesterol + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN)
- Formulación 10
DOTAP/Colesterol + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN) + protamina (0,4 µg/µg ADN)

Todas las formulaciones están realizadas con una concentración de ADN de 10 µg/ml.

Los ligandos transferrina y asialofetuína, y el péptido protamina, se adicionaron siempre a DOTAP/Colesterol o a PEI 25, según la formulación. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió la cantidad de plásmido y tampón HEPES (c.s.p 200 µl) y se mezcló suavemente.

En cuanto a la caracterización fisicoquímica, el tamaño de partícula y el potencial zeta (carga superficial), tanto de los liposomas como de los lipoplejos y los poliplexos, se determinaron en búffer HEPES glucosado por difractometría de láser utilizando un analizador de partículas denominado Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Inc., Reino Unido). Las medidas se realizaron por triplicado.

2.2.c. Estudios de transfección *in vitro*

Para los estudios *in vitro* se utilizaron células HepG2 (hepatocarcinoma humano), HeLa (cáncer cérvico-uterino humano) y CT-26 (cáncer de colon murino). Se platearon 1 x 10⁵ células por pocillo en placas Costar® 3548, 48 WellCell Culture Cluster (EE.UU.), suspendidas en DME-10, 300 µl de DME-10 y 200 µl del complejo correspondiente (conteniendo 1 µg de ADN). Tras 4 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio de transfección y se añadió DME-10 para la expresión del gen de la luciferasa durante 48 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 100 µl de buffer de lisis 1X (RLB, Reporter Lysis Buffer), de Promega (EE.UU.). A continuación, se sometieron a dos

ciclos de congelación-descongelación a -80°C , se recogieron en tubos eppendorfs y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos. Mediante el análisis en el luminómetro Sirius, Berthold detection system (Alemania), se determinaron los ng de luciferasa por mL en base a una recta patrón previamente calculada. Se normalizaron los resultados calculando los mg de proteína mediante el kit Bio-Rad DC™ Protein Assay.

2.2.d. Evaluación de la toxicidad de los poliplexos y lipoplejos

La viabilidad celular fue cuantificada mediante el ensayo “Alamar Blue”. 1 ml al 10% de “Alamar blue” resuspendido en DME-HG suplementado con un 10% (v/v) de suero fue añadido por pocillo 48 horas post-transfección. Después de 2,5 horas de incubación a 37°C , 200 μl del sobrenadante fueron analizados mediante la medida de la absorbancia a 570 y 600 nm. La viabilidad celular fue calculada según la fórmula $(A_{570}-A_{600})$ de las células tratadas $\times 100/(A_{570}-A_{600})$ de las células control.

2.2.e. Estudios *in vivo*

Todos los animales utilizados en este estudio fueron aprobados y controlados por el Comité Ético para la Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Navarra (protocolo ético, 075-11), y tratados de acuerdo a las guías de protección animal. Se utilizaron ratones hembra Balb-C de Harlan Ibérica Laboratories, (Barcelona, España). Se inyectó por ratón un volumen de 200 μl de complejo que contenía 60 μg de ADN. Todas las administraciones fueron llevadas a cabo mediante inyección en la vena de la cola.

En la preparación de los lipoplejos para su utilización *in vivo*, se tuvo en cuenta la caracterización fisico-química, ya que es importante el control de posibles agregados en las formulaciones, que puede provocar la muerte del animal. Para ello, preparamos las formulaciones y las centrifugamos en Amicones® 30K, de Merck Millipore Ltd. (Alemania). El tamaño de partícula y el potencial zeta se determinaron por difracción de láser utilizando un analizador de partículas denominado Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Inc., Reino Unido). Las medidas se realizaron por triplicado. Para la cuantificación *ex vivo* de la actividad de la luciferasa, los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración de las formulaciones. Para evaluar la

distribución y la capacidad de transfección de los complejos *in vivo* se extrajeron los órganos corazón, hígado, pulmón y bazo, y se procedió de la misma manera indicada para la determinación de la expresión de luciferasa *in vitro*.

3. RESULTADOS

3.1. Formulaciones poliméricas.

3.1.a. Caracterización fisico-química

El tamaño de partícula se analizó mediante difracción de rayos láser. Se prepararon formulaciones con polietiliminina 25 kDa (PEI 25) y el plásmido que codifica para la luciferasa a relación N/P 4. Se realizó un seguimiento de las partículas a lo largo del tiempo para asegurar que el tamaño y el potencial zeta eran constantes hasta el momento de su utilización. Se comprobó que, tanto el diámetro como el potencial zeta eran idóneos para realizar los ensayos *in vitro* e *in vivo* preparándose 5 formulaciones distintas:

Formulación 1

PEI 25

Formulación 2

PEI 25 + transferrina (32 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN)

Formulación 3

PEI 25 + transferrina (32 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN) + protamina (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN)

Formulación 4

PEI 25 + asialofetuína (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN)

Formulación 5

PEI 25 + asialofetuína (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN) + protamina (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN)

Todas las formulaciones están realizadas a una concentración de ADN de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

El tamaño obtenido fue óptimo para realizar las transfecciones al igual que el potencial zeta. La adición de los ligandos transferrina y asialofetuína no modificaron significativamente el tamaño de partícula. Sin embargo, sí podemos ver que al añadir transferrina, el potencial zeta disminuye, y que en el caso de la asialofetuína este valor no varía. El potencial zeta siempre fue positivo, el tamaño nanométrico y la polidispersión fue buena, manteniéndose siempre menor a 0,35 (Tabla 1).

Tabla 1. Tamaño y potencial zeta de los poliplexos en las distintas formulaciones.

Formulaciones	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
Formulación 1	134 \pm 6	26 \pm 1
Formulación 2	129 \pm 19	3 \pm 0
Formulación 3	216 \pm 13	5 \pm 2
Formulación 4	100 \pm 19	26 \pm 0
Formulación 5	179 \pm 18	25 \pm 0

3.1.b. Evaluación de la transfección de los complejos *in vitro*

La evaluación de la transfección de los poliplexos preparados con PEI 25 y un gen reportero codificante de la luciferasa se realizó en 3 líneas celulares, HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano), HeLa (células de cáncer cérvico-uterino humano) y CT-26 (células de carcinoma de colon murino). Los resultados obtenidos en las transfecciones, muestran la expresión génica de la luciferasa en presencia de los poliplexos formulados a una

relación N/P 4 y 1 μg ADN, los ligandos transferrina y asialofetuína, y el péptido protamina. En las tres líneas celulares existen receptores de transferrina, y por ello, se ve un aumento en la transfección al añadir transferrina y protamina. En cuanto a la asialofetuína, vemos un aumento en la transfección en el caso de las líneas celulares HepG2 y en CT26. Por otro lado, podemos ver cómo no existe aumento en la transfección con la línea HeLa donde no hay receptores de asialofetuína (Figura 2).

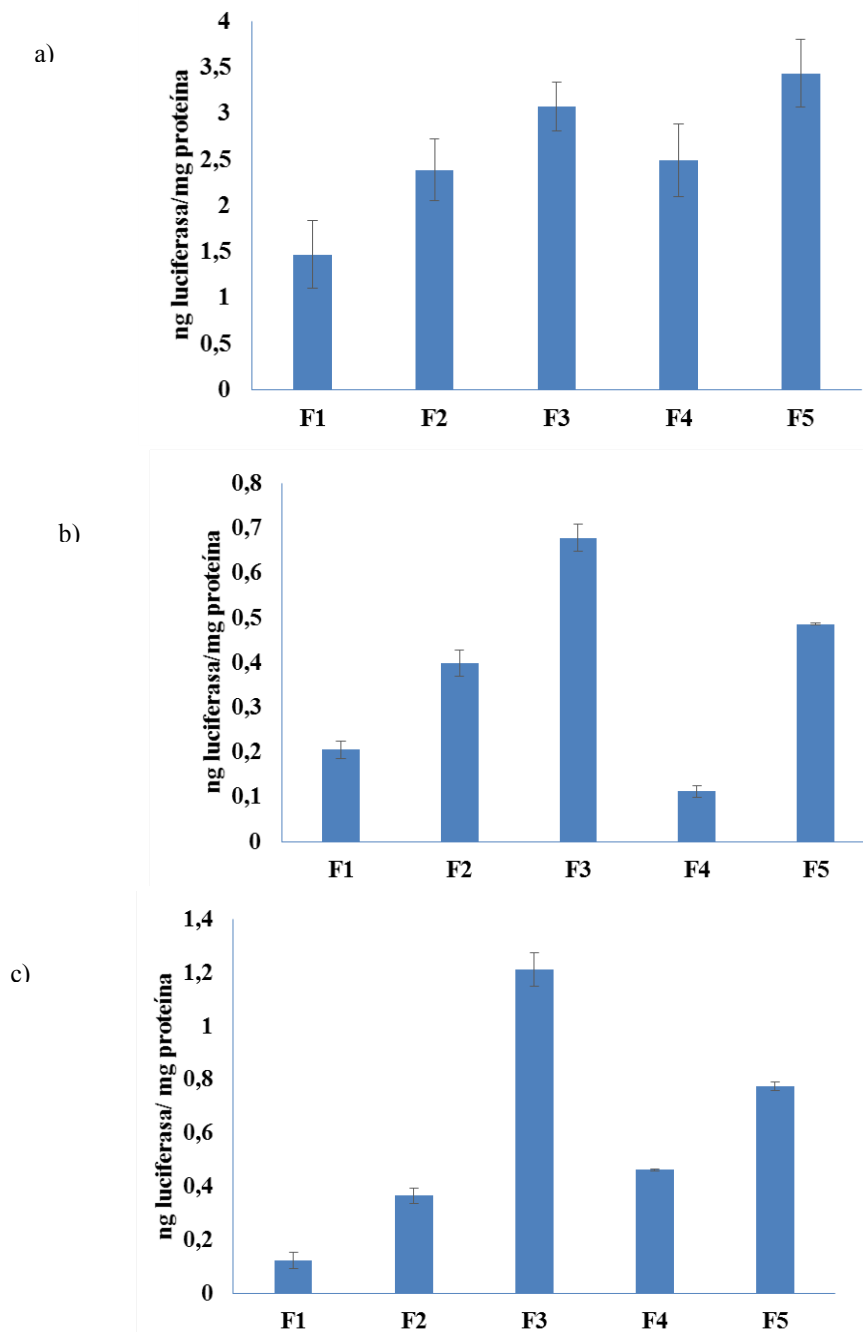


Figura 2. Eficacia de la transfección *in vitro* de los complejos con PEI 25 en células HepG2 (a), HeLa (b) y CT-26 (c). Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos con tres pocillos.

3.1.c. Estudios de toxicidad in vitro

El ensayo “Alamar blue” demostró una viabilidad

superior al 75% en las células transfectadas en los tres tipos de líneas celulares (Figura 3).

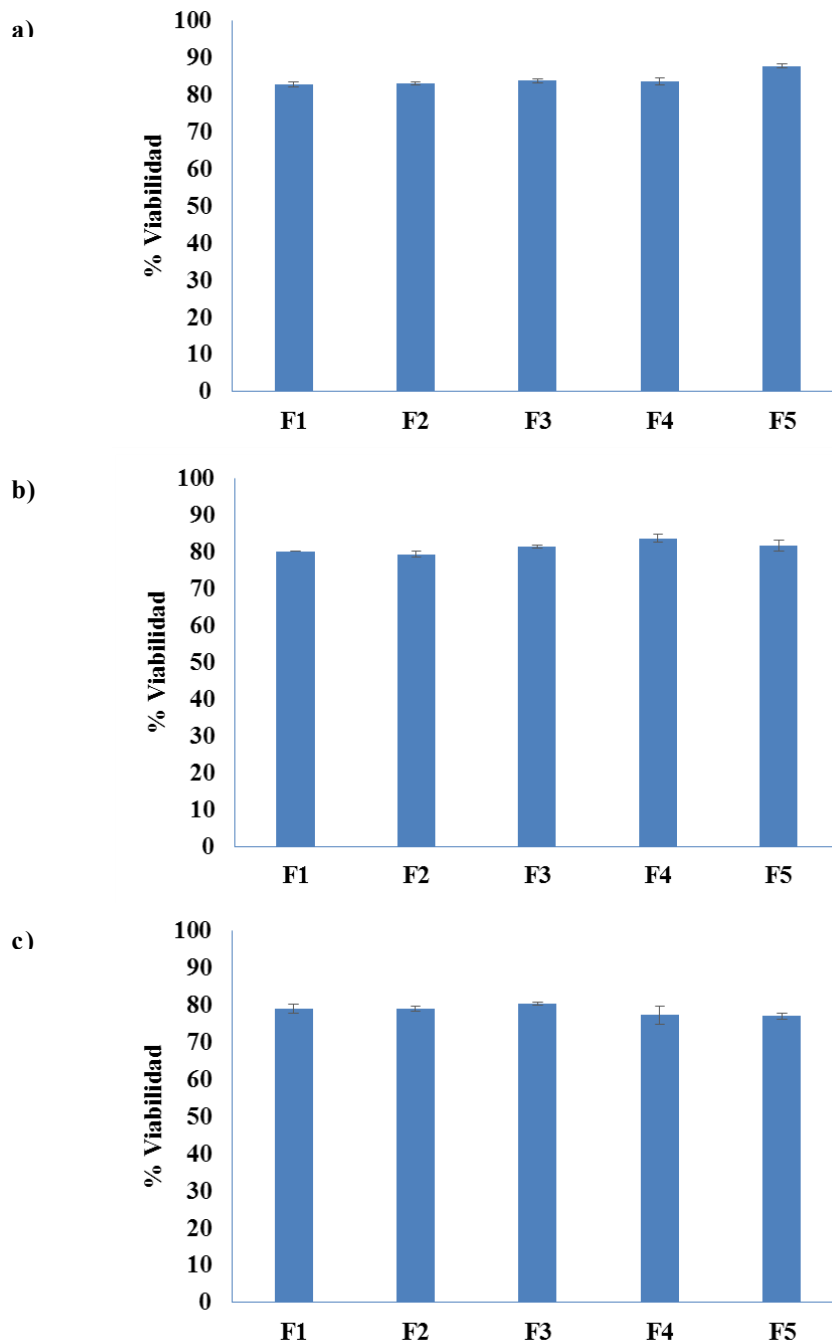


Figura 3. Viabilidad celular en las líneas HepG2 (a), HeLa (b) y CT-26 (c) tras ser transfectadas con poliplejos. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos con tres pocillos.

3.2. Formulaciones lipídicas

3.2.a. Caracterización físico-química

Se realizaron 5 formulaciones diferentes:

Formulación 6

DOTAP/Colesterol

Formulación 7

DOTAP/Colesterol + transferrina (32 µg/µg ADN)

Formulación 8

DOTAP/Colesterol + transferrina (32 µg/µg ADN) + protamina (0,5 µg/µg ADN)

Formulación 9

DOTAP/Colesterol + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN)

Formulación 10

DOTAP/Colesterol + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN) + protamina (0,4 µg/µg ADN)

Todas las formulaciones están realizadas con una concentración de ADN de 10 µg/ml.

Podemos destacar que al añadir protamina el tamaño de partícula disminuye ligeramente debido a la condensación del ADN. En cuanto al potencial zeta, vemos cómo al añadir transferrina el potencial disminuye, aunque

siempre se mantuvo en valores positivos, y al añadir asialofetuína permanece invariable. Las partículas resultaron ser nanométricas, homogéneas y con una polidispersión buena que fue siempre menor a 0,35 (Tabla 2).

Tabla 2. Tamaño y potencial zeta de los lipoplejos formulados.

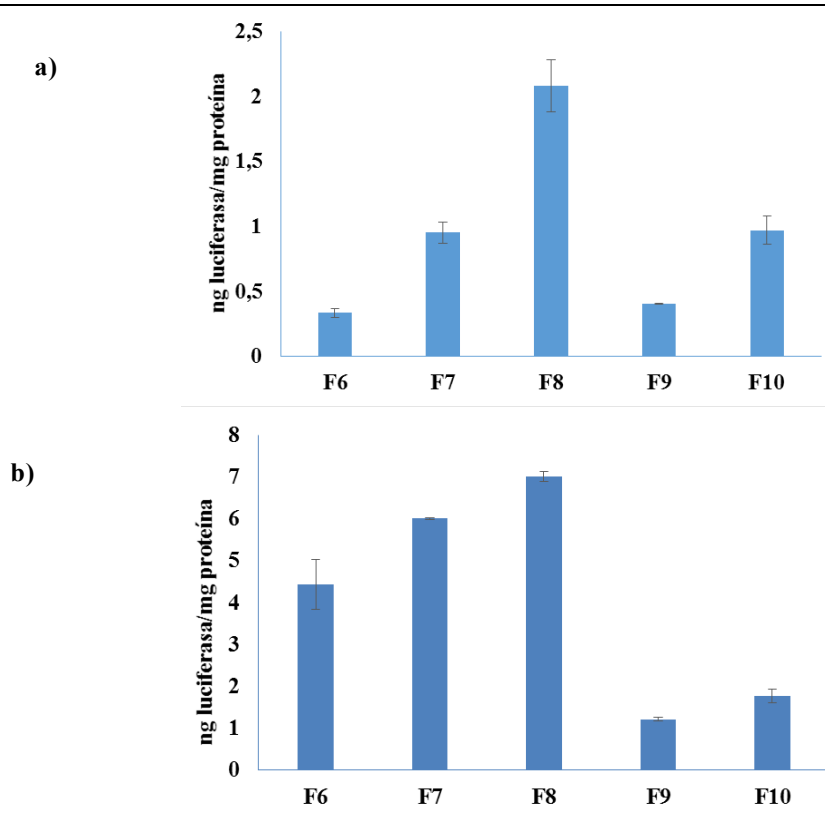
Formulaciones	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
Formulación 6	215 ± 14	35 ± 5
Formulación 7	234 ± 12	1 ± 0,5
Formulación 8	176 ± 19	5 ± 5
Formulación 9	207 ± 8	36 ± 7
Formulación 10	181 ± 9	33 ± 5

3.2.b. Evaluación de la transfección de los complejos *in vitro*

La evaluación de la transfección de los lipoplejos preparados con un gen reportero codificante de la luciferasa se realizó en las mismas líneas celulares que en el caso de los poliplexos.

En este caso, la tendencia en cuanto a mayor o menor transfección es diferente en cada línea celular. Con las

células HepG2 vemos un aumento tanto con transferrina como con asialofetuína, un resultado lógico si tenemos en cuenta que existen receptores para los dos ligandos (Figura 4 a). En cuanto a las líneas HeLa y CT-26, donde existen receptores únicamente para transferrina, el aumento solo es patente con las formulaciones que contienen este ligando, pero no con las de asialofetuína (Figura 4 b y c).



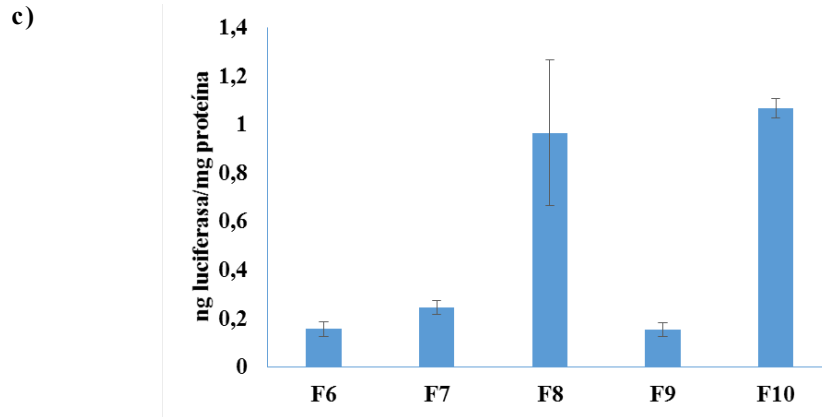
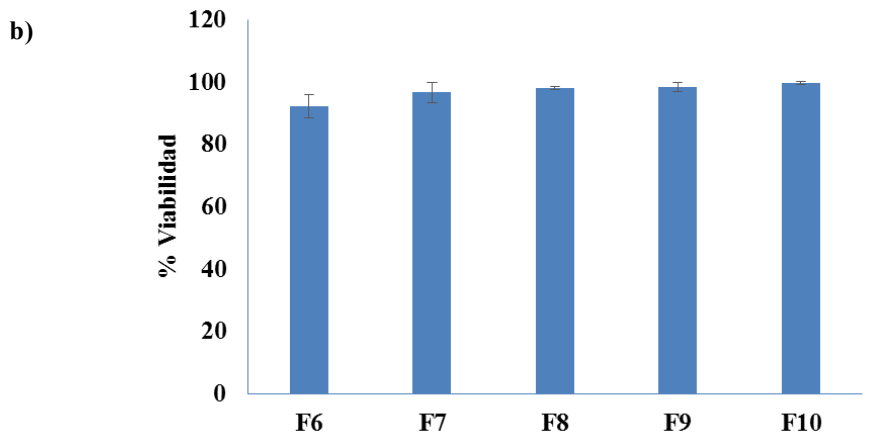
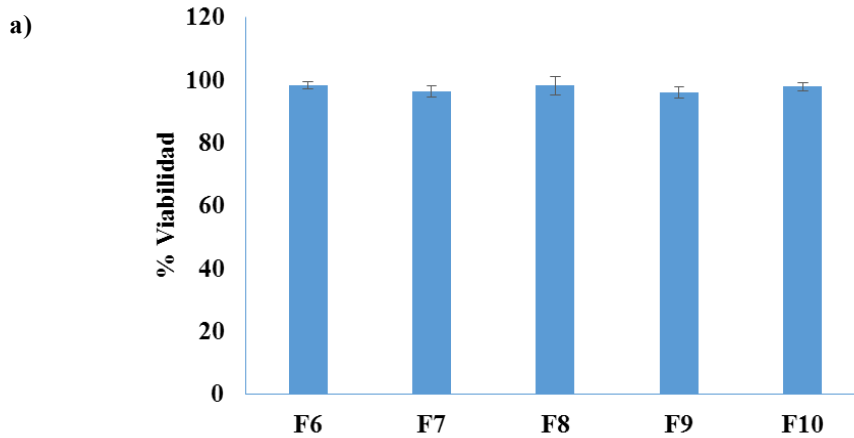


Figura 4. Transfección in vitro con lipoplejos en células HepG2 (a), HeLa (b) y CT-26 (c). Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos con tres pocillos.

3.2.c. Estudio de toxicidad

Se evaluó la viabilidad en los tres tipos de líneas celulares mediante el ensayo de “Alamar blue”. En este

caso la toxicidad fue menor que en poliplejos al obtenerse valores de viabilidad celular mayores o iguales al 95 % (Figura 5).



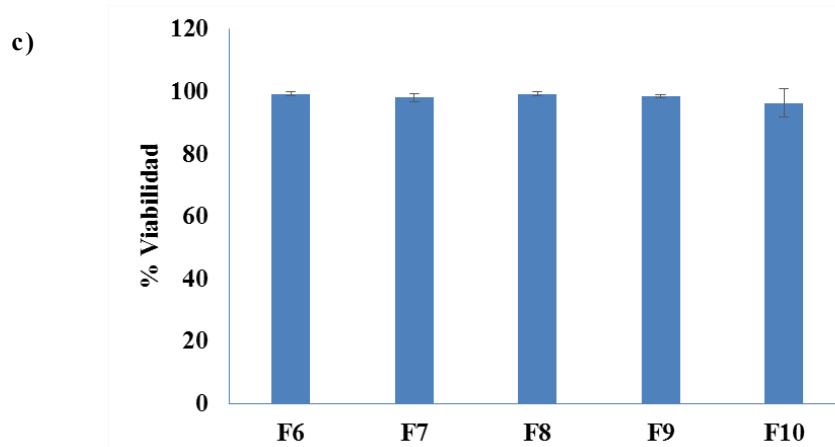


Figura 5. Viabilidad celular de las líneas HepG2 (a), HeLa (b) y CT-26 (c) tras ser transfectadas con lipoplejos. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos con tres pocillos.

3.2.d. Estudios *in vivo*

La expresión génica se evaluó a las 24 horas tras la administración intravenosa de los lipoplejos y poliplexos, tal como está descrito en “Material y Métodos”. En los ratones a los que se administró ADNp libre no se detectaron transfecciones en ninguno de los órganos estudiados. Los poliplexos resultaron ser tóxicos tras su administración.

a) Caracterización físico-química de los lipoplejos

La adición de una mayor cantidad de ADN (60 µg) para formular los lipoplejos *in vivo*, conduce a un aumento del tamaño de partícula como se observa en la Tabla 3. Además la adición de protamina a los complejos nos

conduce a una disminución significativa del tamaño de partícula en comparación con los complejos que contienen únicamente los ligandos, como ocurría en los lipoplejos preparados para los estudios *in vitro*. También podemos ver cómo resultan partículas nanométricas, homogéneas y con una polidispersión buena que fue siempre inferior a 0,35. Según la formulación, el potencial zeta fue más cercano a la electroneutralidad cuando los lipoplejos contenían transferrina y sin variabilidad cuando contenían asialofetuína. Tanto el diámetro como la carga superficial obtenidas, se consideraron óptimos para realizar los ensayos *in vivo*, ya que indican que las formulaciones son estables y no contienen precipitados.

Tabla 3. Tamaño y potencial zeta de los lipoplejos preparados para administración *in vivo*.

Formulaciones	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
Formulación 6	240 ± 0,2	35 ± 2
Formulación 7	292 ± 0,2	-11 ± 1
Formulación 8	275 ± 0,3	3 ± 1
Formulación 9	282 ± 1,0	29 ± 1
Formulación 10	208 ± 0,2	26 ± 2

b) Estudios de transfección *in vivo*

Se realizaron una serie de experimentos para evaluar la distribución y la capacidad de transfección de los complejos *in vivo* en los órganos corazón, hígado, pulmón y bazo. Se procedió a la administración de los lipoplejos con transferrina y se detectó expresión génica a las 24 horas principalmente en pulmón (Figura 6a). Podemos ver cómo el nivel de transfección en la formulación con transferrina y protamina era bastante superior a la obtenida en los ratones a los que se administró ADNp libre, donde

no se detectó transfección en ninguno de los órganos estudiados. Por otro lado, se inyectaron las formulaciones realizadas con asialofetuína con los mismos controles que en el caso anterior. A las 24 horas, se observó una mayor expresión génica en el hígado, y en concreto con la formulación que contenía asialofetuína y protamina, donde se obtuvieron resultados mucho mejores en comparación con los ratones a los que se administró ADNp libre (Figura 6b). En el caso de los lipoplejos la viabilidad de los animales fue del 100 %.

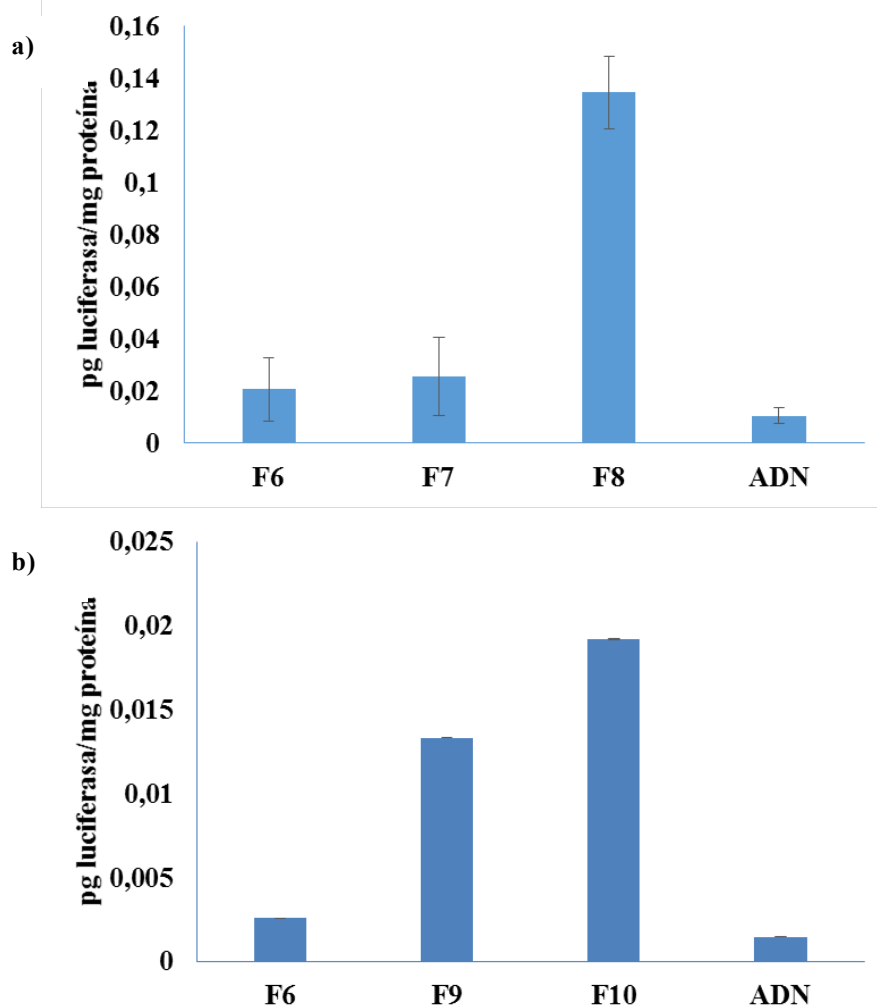


Figura 6. Eficacia de la transfección in vivo de los lipoplejos formulados con 60 µg ADN/ratón, a relación de cargas (+/-) 5/1 en pulmón (a) y en hígado (b). Los resultados representan la media y la desviación estándar (n=8).

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de los lipoplejos frente a poliplexos, en cuanto su eficacia de transfección. Un punto importante a la hora de formular los vectores no virales es el tamaño de partícula y la carga superficial. Se ha demostrado que estas dos variables condicionan la eficacia de transfección (14). Los resultados que hemos obtenido con el polímero PEI 25 han mostrado que las partículas son nanométricas y constantes en cuanto al tamaño de partícula (15). En cuanto al potencial zeta podemos afirmar que, según lo esperado, disminuía cuando las formulaciones contenían transferrina, y permanecía invariable cuando había asialofetuína. Aunque los dos ligandos tienen carga negativa, la cantidad de asialofetuína quizá no sea lo suficientemente grande como para provocar un descenso en el potencial zeta (Tabla 1). Por otro lado, cuando realizamos la caracterización físico-química de los lipoplejos comprobamos que eran homogéneos, en un rango nanométrico y constantes en el tiempo en cuanto a tamaño de partícula y potencial zeta según la formulación (Tabla 2). Se observa cómo las formulaciones con transferrina y

asialofetuína no presentan diferencias significativas en cuanto al tamaño de partícula con respecto a la formulación “no dirigida” (Formulación 6). La ligera variación en el tamaño es debido a que la adición de un ligando puede afectar aumentando el tamaño final de la formulación. Paralelamente, en los lipoplejos formulados con protamina (Formulaciones 8 y 10), el tamaño disminuye ligeramente, mostrando el efecto condensador que tiene este péptido sobre el ADNp. Podemos comprobar cómo al añadir transferrina, el potencial zeta se acerca a la electroneutralidad, ya que es un ligando negativo, y como ocurría con los poliplexos, al añadir asialofetuína, el potencial permanece invariable y positivo, aunque éste también sea negativo. Estos resultados están en consonancia con lo obtenido por otros autores en trabajos con este tipo de vectores y ligandos (5, 6, 16).

La existencia de receptores para transferrina y asialofetuína sobreexpresados en órganos con tumores facilitan la especificidad de la terapia génica con vectores dirigidos a todo tipo de tumores en el caso de la transferrina, y a tumores hepáticos en el caso de la asialofetuína. Otros autores han seguido estrategias

similares, como por ejemplo, la preparación de lipoplejos con transferrina para la expresión del gen IL-12 en el tratamiento del cáncer de colon (17). Es bien sabido que el tamaño de partícula y el potencial zeta influyen en la eficacia de la transfección tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo favorable un tamaño nanométrico (16). En cuanto a los estudios de evaluación de la eficacia de transfección *in vitro* con el gen reportero de la luciferasa se demuestra que existe eficacia de transfección tanto en el caso de los poliplejos con PEI 25 como de los lipoplejos. Como se muestra en la Figura 2, entre las distintas formulaciones de PEI 25 resultaban mejores las formulaciones realizadas con transferrina y protamina en las tres líneas celulares, y con las de asialofetuína y protamina en HepG2 y CT-26. Al comparar estos resultados con los obtenidos con los lipoplejos, recogidos en la Figura 4, podemos decir que la trayectoria a seguir en cuanto a eficacia de transfección es la misma para las células HepG2 y HeLa, siendo diferentes los resultados obtenidos con CT-26 donde sólo se obtuvo transfección con transferrina y protamina. Otros trabajos, han remarcado la importancia en la transfección de la protamina, al estudiar cómo afectan distintas cantidades de protamina a la transfección *in vitro* de lipoplejos de asialofetuína (6). Las formulaciones con protamina transfectan mejor debido a la condensación que ejerce este péptido sobre el ADN, y permitiendo a las partículas acceder de una forma más específica a su objetivo (16). En el caso de los lipoplejos se cumplen las hipótesis de que en las líneas celulares estudiadas donde existen receptores de transferrina (HepG2, HeLa y CT-26, Figura 4) se produce una transfección efectiva, al igual que en las que tienen receptores de asialofetuína (HepG2, Figura 4a). Sin embargo, no podemos decir que tal efecto se produzca con los poliplejos, ya que en las células CT-26 que no tienen receptores de asialofetuína, se observa transfección con las formulaciones de asialofetuína (Figura 2c).

También se evaluó la toxicidad celular de las formulaciones mediante el ensayo de "Alamar blue". Aunque la eficacia de transfección *in vitro* era similar entre las formulaciones con PEI 25 y con liposomas, donde se vio una diferencia significativa fue en el ensayo de viabilidad. En todos los casos, la toxicidad fue mayor con los poliplejos que con los lipoplejos.

Al realizar el estudio de transfección *in vivo*, 24 horas tras la administración de los lipoplejos se estudiaron las formulaciones realizadas con transferrina, y transferrina con protamina (Formulaciones 7 y 8). Los mejores resultados fueron observados en pulmón con la formulación 8 formulada con transferrina y protamina (Figura 6a). Esto puede ser debido a que la protamina por un lado, tiene la habilidad de condensar el ADN y de actuar de forma sinérgica con las interacciones catiónicas de los lípidos aumentando la transfección génica (7), y por otro lado, por la alta vascularización que tiene el pulmón, como ocurre en el caso de los poliplejos PAMAM (G5) (9). Además, es probable que ejerza un efecto protector en el ADN de la degradación por nucleasas (11). Por otro lado, el ligando transferrina asociado en este complejo

parece facilitar la internalización del mismo a través de la habilidad de este ligando para estimular la endocitosis. El exceso de receptores de transferrina en los órganos con tumores, hace que el reconocimiento de los complejos con transferrina en la superficie de las células tumorales, sea mejor facilitando la endocitosis mediada por receptor, y por lo tanto la transfección (16).

Por otro lado, se evaluaron las formulaciones formadas con asialofetuína (Formulaciones 9 y 10). La mayor eficacia de transfección fue en el hígado con la formulación compuesta por asialofetuína y protamina (Figura 6b). La unión de la asialofetuína y la protamina asegura la transfección del plásmido al núcleo celular y la reducción del tamaño de partícula, siendo dos motivos por los cuales aumenta la eficacia de transfección (6). La presencia de receptores de asialoglicoproteínas en los hepatocitos hace que las formulaciones con asialofetuína vayan dirigidas fundamentalmente a la terapia génica del hígado. Fenómenos similares se han descrito para el mismo tipo de ligandos formulados con lipoplejos (11, 16).

5. CONCLUSIONES

a) Tanto los lipoplejos como los poliplejos formulados en este estudio han resultado ser de tamaño nanométrico, homogéneo, y con carga superficial positiva.

b) Las formulaciones preparadas con lipoplejos en presencia de los ligandos transferrina y asialofetuína, y el péptido protamina, aumentan la transfección en todos los tipos celulares estudiados; las de asialofetuína con protamina en HepG2, y las de transferrina con protamina en HepG2, HeLa y CT-26.

c) Los lipoplejos presentan una toxicidad mucho menor con resultados de viabilidad celular superiores a los obtenidos con los poliplejos.

d) Las formulaciones preparadas mostraron ser eficaces también *in vivo*. Los lipoplejos lograron una mayor transfección en presencia de los ligandos. Los resultados fueron aún mejores en presencia de las formulaciones que contenían los ligandos con protamina, siendo específicas del pulmón en el caso de la formulación con transferrina y protamina, y del hígado con la de asialofetuína y protamina, con la total supervivencia de los animales.

Interés general, aplicaciones prácticas y aportación del trabajo en el campo de nuevas perspectivas curativas del cáncer.

Según los expertos, el desarrollo y la mejora de vectores para la transferencia de genes aparece como un área de investigación, cuya importancia es crítica para el futuro de la terapia génica del cáncer. La tecnología farmacéutica y en concreto la nanotecnología ha ganado experiencia en relación con las formulaciones de administración de agentes terapéuticos. En concreto, el desarrollo de nanosistemas para la liberación controlada y la vectorización de fármacos ofrecen un importante fundamento al desarrollo de la terapia génica.

Lo más importante e innovador de las formulaciones propuestas en este estudio es no sólo el aumento de su eficacia, sino la disminución en la toxicidad de los

vectores existentes hasta el presente. Por otra parte, el conocimiento del mecanismo de acción de estos vectores representa una notable contribución para el futuro diseño y desarrollo de otros nuevos sistemas de la misma clase. Otra ventaja importante de estas formulaciones es su sencillez, en cuanto a la metodología de preparación, eficacia y bajo coste. Además, las mejoras obtenidas en el tratamiento de esta enfermedad se espera sean acogidas con rapidez por parte de la industria, procediéndose, si es el caso, a patentar todos aquellos métodos tecnológicos de preparación, que han llevado a nuevas formulaciones con potencial terapéutico.

Por todo esto, consideramos que la aplicación con éxito en un futuro de las formulaciones propuestas, supondría un gran avance en el ámbito de la terapéutica tumoral y por lo tanto un importante logro dentro de las metas actuales de la terapia génica del cáncer.

6. CONFLICTO DE INTERESES

No hay ningún conflicto de interés relacionado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación de la Fundación Universidad de Navarra (FUN).

7. REFERENCIAS

1. Talavera Díaz A. Terapia génica. Ed. Ephemera. Madrid, 2004: 79-103.
2. Rehman Z, Zuhorn IS, Hoekstra D. How cationic lipids transfer nucleic acids into cells and across cellular membranes: Recent advances. *Journal of Controlled Release* 2013; 166:46–56.
3. Huang L, Hung MC, Wagner E. Nonviral vectors for gene therapy. *Advances in genetics*. Ed. Elsevier; San Diego, 2005: 7.
4. Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet M. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1820: 291-317.
5. Tros de Ilarduya C, Düzgünes N. Efficient gene transfer by transferrin lipoplexes in the presence of serum. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1463: 333-342.
6. Arango MA, Düzgünes N, Tros de Ilarduya C. Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes. *Gene Therapy* 2003; 10: 5-14.
7. Delgado D, Rodríguez Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Echevarría E, Pérez Ruiz de Garibay A, Rodríguez JM, Solinís MA. Dextran-Protamine-Solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: In vitro characterization mice. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 425: 35-43.
8. Von Gersdorff K, Sanders N, Vandenbroucke R, De Smedt S, Wagner E, Ogris M. The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Molecular therapy* 2006; 14(5): 745-753.
9. Navarro G, Maiwald G, Haase R, Rogach AL, Wagner E, Tros de Ilarduya C, Ogris M. Low generation PAMAM dendrimer and CpG free plasmids allow targeted and extended transgene expression in tumors after systemic delivery. *Journal of Controlled Release* 2010; 146: 99-105.
10. Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin -PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy* 1999; 6: 595-605.
11. Hara T, Ishihara H, Aramaki Y, Tsuchiya S. Characteristics of the binding of asialofetuin-labeled liposomes to isolated rat hepatocytes. *International Journal of Pharmaceutics* 1991; 67: 123-129.
12. Kircheis R, Wightman L, Schreiber A, Robitza B, Rössler V, Kursa M, Wagner E. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Therapy* 2001; 8: 28-40.
13. Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discov Today* 2002; 7: 479-85.
14. Taira K, Kataoka K, Niidome T. Non-viral gene therapy: gene design and delivery. Ed. Springer-Verlag. Tokio. 2005; pp 11.
15. Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, Wagner E. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Therapy* 1998; 5: 1425-33.
16. Tros de Ilarduya C, Arango MA, Moreno-Aliaga MJ, Düzgünes N. Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1561: 209-221.
17. Tros de Ilarduya C, Buñuales M, Cheng Q, Düzgünes N. Antitumoral activity of transferrin-lipoplexes carrying the IL-12 gene in the treatment of colon cancer. *Journal of Drug Targeting* 2006; 14(8): 527-535.



Sesión Necrológica en memoria del Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana, Madrid, 25 de mayo de 2017

Intervienen:

Bartolomé Ribas Ozonas, Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

Juan Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Rafael Sentandreu Ramón, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Francisco González de Posada, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y de Número de la Real Academia de Medicina



Román De Vicente Jordana, el Académico

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Sr. Presidente, Excmas. Sras. y Sres Académicos, Familia del Excmo. Sr. Don Román De Vicente Jordana, Sras. y Sres.

Expreso mi agradecimiento a la Junta de Gobierno, que me haya designado para expresar estas palabras, en homenaje y agradecida memoria, del que fuera nuestro compañero y amigo, el Académico Román de Vicente Jordana. Los Académicos aquí presentes y en línea agradecemos la entrañable compañía de su familia, en esta Sesión de homenaje a su persona.

Nombramientos. Román de Vicente Jordana nace el 6 de septiembre de 1920 en Zaragoza, Reino de Aragón. Maestro Nacional en 1940. Licenciado en Farmacia en 1949; y en Medicina y Cirugía en 2003. Doctor en Farmacia con Premio Extraordinario, Doctor en Medicina; Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Master of Science en la Universidad de Cambridge, Inglaterra en 1957, Consejero adjunto y exVocal del Consejo Técnico Asesor del Patronato Santiago Ramón y Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Consta que recién terminada su carrera fue invitado por el Jefe de Departamento a integrarse como Profesor de Clases Prácticas en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Y fue Jefe del Departamento de Bacteriología y de la Unidad de Fitobacteriología del Instituto de Microbiología Jaime Ferrán del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Sobre su vida científica y docente universitaria dará amplia información nuestro compañero Académico D. Rafael Sentandreu Ramón, que se caracteriza por su elocuencia y fraternidad.

Académico Correspondiente. Nuestro compañero Román de Vicente ingresó como Académico Correspondiente propuesto por los Académicos D. Ángel Santos Ruiz; D. Manuel Lora Tamayo y D. Lorenzo Vilas López en el año 1962; y su discurso tuvo por título: *Acción de la temperatura en la determinación de un foco de intoxicación alimenticia, en alimentos congelados*. Como vemos era un experto en análisis microbiológico de alimentos. Resolviendo una intoxicación, embarcándose en un transatlántico desde Barcelona a Cádiz, que viajaba desde Italia a Suramérica, en el que solicitaron ayuda que proporcionó Román de Vicente, que resolvió la causa de la infección con éxito.

El discurso de presentación corrió a cargo del Académico Lorenzo Vilas López, su mentor y Jefe en la Cátedra de

Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Quien comenta sobre Román: “Yo he sido testigo de toda su vida científica. Desde cuando marchó como becario a la Universidad de Cambridge, a trabajar sobre virus vegetales con Kenneth Smith, cambiando luego al Departamento de Botánica con W.J. Dowson, donde le surgió la idea del *citoarjé*, que, como toda innovación fue controvertida, obteniendo finalmente el título de Master of Science”.

Académico de Número. Por otra parte, en la Memoria de Secretaría consta que Román de Vicente ingresó como Académico de Número, y tomó posesión de la plaza con medalla nº 15 el 8 de mayo de 1986. La propuesta de Román De Vicente fue presentada por los Académicos Sres. Lorenzo Vilas López, D. Ángel Santos Ruiz y D. Manuel Lora Tamayo. Ocupó la vacante producida por el fallecimiento del Académico. D. Ramón Turrientes y Miguel predecesor en la misma. Su discurso de toma de posesión tuvo por título: *Reflexiones sobre la biogénesis del ontos (ser) y del oncos (tumor) en la unidad de la función citoarjé.*

En la alabanza en homenaje a su predecesor, nuestro compañero Román de Vicente se expresa con las siguientes palabras: “bien quisiera tener yo la métrica y el corazón del poeta para glosar una bella elegía que honrase a mi querido predecesor en la medalla número 15 de esta Real Academia” y continúa diciendo que las musas le negaron ese don, y señala que “es en esa parte del hombre, en su espíritu, donde se marca la personalidad, que hay que recordar. Es en el sedimento que queda en el corazón de los amigos y es en lo escrito donde hay que buscar el espíritu del hombre que se fue”. Esas palabras muestran el espíritu de nuestro Académico que nos dejó, Román De Vicente Jordana.

Correspondió la contestación a su discurso al Académico Sr. D. Lorenzo Vilas López. En cuya intervención comentó: “el discurso que el nuevo Académico presenta, de noventa páginas de cuidada redacción, nos introduce, con ejemplos especialmente escogidos, en lo que representa su denominada función citoarjé”. En su discurso, hace una defensa apasionada de lo que ha sido el trabajo de su vida investigadora, la función citoarjé, un modelo funcional del biosistema o estado viviente.

Continuó diciendo el Académico Lorenzo Vilas: “Yo me permitiría destacar del conjunto de su trabajo que, lo relativo a los por él denominados microoncozoos, que no cabe duda merece nuevas confirmaciones experimentales que permitan el aislamiento para poder demostrar así sus actividades biológicas. El resto del discurso es un resumen del aporte experimental que el método científico exige como base para el planteamiento teórico. Lo expuesto en su discurso “sabe a poco” y la Academia espera sus nuevas aportaciones dentro de las sesiones científicas semanales que celebramos”.

Esta propuesta de citarle en un futuro próximo acaeció con motivo del solemne acto protocolario de apertura de curso académico, el 18 de enero de 1990, para el que Román de Vicente lo tituló *El grave peligro de pensar*. Un verdadero ensayo literario redactado con la fluidez y elegancia de la que hace gala su autor en todos sus escritos, y en el que se aborda, con perspectiva histórica, el tema de la libertad de expresión, en el contexto de los derechos humanos.

No comento la faceta científica, porque lo hará mi compañero Rafael Sentandreu Ramón. Sí añado las últimas palabras del discurso de Lorenzo Vilas López, que finalizan así: “Enhorabuena al nuevo Académico y también a la Academia, por el nuevo miembro científico revolucionario, aunque ocasione algún dolor de cabeza. Pero para eso estamos, mientras Dios nos la conserve sobre los hombros y nos quiera ayudar con su espíritu, lo que sinceramente le pido”. Agradecemos de corazón, el bien que aportó Román durante su vida activa académica en sintonía comunitaria en la Real Academia Nacional de Farmacia.

Actividades académicas. En relación con sus actividades académicas, consta en Secretaría que Román de Vicente fue adscrito a su ingreso a la Sección 5ª, a la sazón denominada de “Higiene y Deontología”, hoy 6ª de la que Román de Vicente fue su Presidente con el nombre de “Historia, Legislación y Bioética.

Consta en su expediente que en el Concurso de Premios del año 1953 se le otorgó el Accésit del Premio de la Real Academia por el trabajo titulado *Un efecto bacteriostático en los tubérculos germinados de la planta*”.

Fue delegado de España en la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología desde 1955 a 1986.

En el año 1964 pronunció la conferencia en sesión científica con el título: *Aislamiento de un agente arjesómico de carácter bacteriostático.*

En el año 1967 fue elegido miembro honorario de la Academia de Medicina de Río de Janeiro, Brasil, junto con su padrino y Director de Departamento, Académico de Número de esta Real Corporación D. Lorenzo Vilas López.

Y en el año 1972 intervino en otra sesión científica académica, con el título: *Incompatibilidad citoárgica entre Penicillium sp. y Erwinia carotovora vav. Aroideae.*

Y de nuevo en el año 1973, interviene con el título: *Diferenciación entre el proceso de citoarjesis y otras formas de resistencia de las plantas a la infección.*

Fue Secretario General de la Jornada Internacional de Política Científica de 1973. Y Presidente del Primer Congreso de la Sociedad Internacional de Biología y Ética, que tuvo lugar en Madrid en el año 1977.

Por acuerdo de la Junta de Gobierno se le nombra ponente para la Sesión Necrológica en Memoria del Académico. Sr. Lorenzo Vilas López, que cuenta con su entusiasta colaboración, y se celebra el jueves 4 de mayo de 1989.

Y también consta en esta Secretaría que Román de Vicente, el 18 de Enero de 1990, en esta Real Academia leyó el protocolario discurso de la solemne Sesión de apertura de curso académico, ya mencionado antes.

En 1994, el Prof. Dr. Román de Vicente Jordana fue nombrado Fellow de la World Academy of Art and Science de EE.UU. por su contribución en investigaciones básicas del cáncer. Y es elegido vocal de su Comité Ejecutivo para Europa e invitó al que les habla a ser miembro de la misma.

Román de Vicente hizo la presentación de los siguientes Académicos correspondientes: Prof. Dr. D. Carl Göran Hedén (Suecia), Prof. Dña. Carmen de la Rosa Jorge (España), Prof. Dr. Francisco Velasco de Pedro (España), Prof. John H. Proctor, Dr. D. Ernesto Fernández Bernardo (Chile).

Contestó al discurso de Eduardo Primo Yúfera en su ingreso como Académico de Honor en 2002. El título del discurso fue: *Nuevas tendencias en la lucha ecológica contra insectos: El caso de la Ceratitis capitata*.

En el año 2005, como señalamos antes, Román de Vicente es elegido Presidente de la Sección 6ª de Historia, Legislación y Bioética, vacante por fallecimiento de su titular, el Académico Antonio Portolés Alonso, que lo fue de 1993 a 1999. La Sección 5ª, se denominaba de “Higiene y Deontología”, y en el año 1999 pasó, por la modificación de Estatutos de 1990, a llamarse Sección 6ª de “Historia, Legislación y Bioética”. Y cuyo Presidente es en la actualidad la Académica Dña. Rosa Basante Pol y Secretario el Académico de esta Real de Farmacia y de la Real de la Historia D. Francisco Javier Puerto Sarmiento.

Finalmente comentamos el apasionado entusiasmo que mostró por esta Real Academia, y con el acicate, como tienen fama los aragoneses, también su simpatía y conexión por sus compañeros académicos. En activo acudió a todas sus Sesiones científicas mientras su salud se lo permitió. De continuo mantuvo una intensa y original actividad científica, académica y social con sus amigos, era Miembro de Honor de la Casa de Aragón en la que en cierta ocasión me invitó a comer. La relación con sus amigos la mantuvo a lo largo de toda su vida. Le visité el día anterior a su fallecimiento. Trataba con ilusión y entusiasmo los temas de su vocación investigadora, sus discursos eran originales e impactantes, como hemos mencionado antes, además por su terminología científica y cultural. Era un excelente español que conocía bien la historia del Reino de Aragón, sobre el que me comentó numerosas vicisitudes, por lo que poseía una amplia formación y cultura, no solo científica sino también en humanidades.

Nos deleitó como autor del tema citoarjés. Y nos queda su recuerdo, que no es poco. En su acierto está su amor, su inteligencia y entusiasmo en todos los temas que le concernían, y doy fe que lo hacía con apasionado interés y vigor. Era un aragonés, con toda energía, fruición y empeño, del que guardamos un hermoso recuerdo.

Muchas gracias por su atención.



Román de Vicente Jordana, amigo

Juan Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia; querida familia de Román: esposa, Consuelo; hijos, Marta, Román, Juan, Cristina, Clara y Alicia; nietos, Pablo, Álvaro, Gonzalo, Rafa, Sofía, Marta y María; hermanas, Magdalena (Manena), Tere y Merche; Excelentísimas Sras. Académicas; Excelentísimos Sres. Académicos; Señoras y Señores:

Cuando la Junta de Gobierno de la Real Academia Nacional de Farmacia me ofreció la posibilidad de actuar en esta sesión necrológica en recuerdo y homenaje de nuestro compañero Román de Vicente Jordana, me sentí honrado y acepté gustoso.

En primer lugar, tengo que pedirle perdón a él porque no le he hecho caso en algo que le oí comentar en cierta ocasión: que a su muerte no quería que la Academia le dedicara una sesión necrológica como la que en estos momentos vamos a celebrar. Estoy seguro que hoy daría su brazo a torcer, aceptando con agrado este recuerdo que, en nombre de la institución, le vamos a dedicar con todo cariño los académicos ponentes que intervendremos en este acto así como todos los presentes.

Román nació en Zaragoza el 6 de septiembre de 1920. Era el mayor de ocho hermanos: Román, Jorge, Mariano, Maribel, Pili, Magdalena (Manena), Tere y Merche. Todos ellos nacidos en Zaragoza, excepto Merche que nació en Madrid.

A pesar de la diferencia de edad que había entre nosotros dos, Román era catorce años mayor que yo, acepté intervenir en este acto como “amigo”, tal como dice el título de mi intervención: *“Román de Vicente Jordana, amigo”*. De hecho, él me recordaba en ocasiones que hace muchos años se refería a mí como “el zagal” que era amigo de la adolescencia de su hermana pequeña Merche. En efecto, durante las vacaciones de verano que ambas familias pasábamos en Jaca, mis hermanas y yo íbamos a jugar por las tardes con mucha frecuencia al jardín de su casa –“Villa Parsifal”– situada al final del paseo junto al rompeolas con su inconfundible olor a boj, hoy día convertida en urbanización. Tengo que decir que si él se refería a mí como “el zagal”, sus hermanas –mis amigas– se referían a él como “el sabio”. Así lo consideraban en su casa. Sin duda que su afán de saber estuvo acreditado por su doble titulación y doctorado en Farmacia y en Medicina. Incluso yo me encontré con él en varias ocasiones en los pasillos de la Facultad de Biología porque asistía como oyente a las clases de algunas asignaturas para ampliar sus conocimientos. ¿Quién nos iba a decir que cincuenta años más tarde coincidiríamos como miembros de esta Real Academia Nacional de Farmacia? No obstante, no me corresponde a mí hablar en este acto de su perfil científico y académico que expondrán, respectivamente, en este acto su compañero de área científica el Dr. Rafael Sentandreu Ramón y el Dr. Bartolomé Ribas Ozonas, Académico Secretario de esta Academia. Solamente diré que desde hace muchos años he conocido su teoría del “*citoarjés*” y el empeño con que Román la defendía. Sí me consta que, como no podía ser de otra manera, su familia compartía con él la pasión y los avatares de la misma. Román era luchador como pocos. Hasta el final de su vida mantuvo su actividad científica creadora. Su libro *“Afanozoos en los arcanos del cáncer”* publicado en 2007 y otro libro, que terminó poco antes de morir, sobre el tema *“oiko-dependientes en su función citoarjés y armónicos en imagen”*, que su familia se encargará de editar como un legado de su vida científica, son buena prueba de ello.

Cuando en 1995 presenté mi candidatura para ocupar la Medalla número 1 de esta Real Academia Nacional de Farmacia correspondiente a doctores en “ciencias afines” que había quedado vacante por fallecimiento del Profesor Alfredo Carrato Ibáñez, otro ilustre zaragozano, Román vino a verme a mi despacho de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense para decirme que él no me votaría porque tenía comprometido su voto con otro candidato, pero que a la siguiente oportunidad podría contar con él. Afortunadamente para mí, no fue necesario porque gané la votación. De cualquier manera, eso se llama juego limpio y “nobleza baturra”, como decía el título de una conocida película española. Así era Román.

La última vez que vi a Román fue un mes antes de morir porque coincidimos en el Centro Ambulatorio de Salud de la calle Quintana, a donde él había acudido por sus propios medios desde Pozuelo porque, me dijo, no quería perder su autonomía. Aprovechamos el tiempo de espera en la consulta para hablar, una vez más, de la Academia y comentar sin acritud lo sucedido durante los últimos años. Lo mismo que se habla de la “flema británica” se puede hablar de la “tozudez aragonesa”. Román, como buen aragonés –y yo también lo soy– era tozudo y eso le llevaba a mantener sus convicciones con firmeza. Para mí, como amigo, fue un consuelo comprobar que su familia decidió que en su esquelera figurara como Académico de esta Real Academia Nacional de Farmacia. También a vosotros, su familia, os estará regañando por vuestra bendita desobediencia. En cualquier caso, teniendo en cuenta que Román había inculcado a sus hijos valores como son el perdón y el no ser rencoroso y que él era de los que predicaba con el ejemplo, seguro que ya todos hemos sido perdonados

por él por no haber seguido las órdenes que nos dio en vida.

Román, el amigo.

Según la Real Academia Española de la Lengua, la amistad es el “afecto personal, puro y desinteresado, compartido con otra persona, que nace y se fortalece con el trato”. La amistad es una relación de afecto, simpatía y confianza que se establece entre personas que no son familia. Aristóteles dedica los libros VIII y IX de los diez que componen su “*Ética a Nicómaco*” para tratar del valor de la amistad. ¡Qué importante es la amistad! ¡qué triste es la vida sin amigos!

Posiblemente podría decirse que Román era más de amistades que de familia, sin que ello vaya en demérito de su relación con sus familiares más cercanos: esposa, hijos y nietos. Sus amistades incluían un gran abanico de personas, desde el sereno de su casa (cuando lo había), el conductor del autobús (al que convenía para que le parara donde le convenía) o los socios de la Casa de Aragón donde acudía con frecuencia a conferencias y tertulias. En relación con nuestras raíces aragonesas, desde hace unos cuantos años, yo pertenezco a la “Peña Moncayo” y nos reunimos a comer, con su correspondiente tertulia, el último viernes de cada mes entre diez y quince aragoneses (me atrevería a decir “de pro”) de las tres provincias (Zaragoza, Huesca y Teruel) residentes en Madrid y la verdad es que no sé por qué Román no pertenecía a ella porque hubiera sido un contertulio extraordinario. Sus raíces aragonesas le llevaron a tener cierta vinculación con el Partido Aragonés Regionalista (el PAR), manteniendo una relación más estrecha con **Juan Carlos Trillo**. A lo largo del tiempo mantuvo amistades en Zaragoza (**José Luis Roncalés**, farmacéutico) y en Jaca (**Agustín Valero**).

Mantenia relación de amistad con muchos vecinos de Pozuelo, donde residía, con quienes se reunía con cierta frecuencia para tomar el aperitivo o comer después de la misa dominical. Aquí podría citar, omitiendo los apellidos, a **Manolo**, **Agustín**, **Simón** y **Santiago**.

Muchos sábados se reunía con compañeros farmacéuticos entre los que sobreviven **José María Alfaro** y **Manolo Ortega** (miembro de esta Academia) y otros muchos que ya han fallecido (**Emilio Fernández Galiano** que fue también miembro de esta Academia, **Paco Morán**, **Tomás Gil**, **Enrique Flores** y **Pablo González Ameijide**).

En el ámbito profesional del Consejo Superior de Investigaciones Científicas hay que mencionar en primer lugar a **Lorenzo Vilas** (su mentor y miembro de esta Academia, ya fallecido) así como a sus compañeros **Miguel Rubio** (miembro de esta Academia, también fallecido), **Rodrigo Moreno**, **Manolo Santolalla** y **Fernando Silió**. Aquí es obligado mencionar también a nuestro compañero académico **Julio Rodríguez Villanueva** y su esposa **Isabel Acha**. Dentro del CSIC hay que mencionar también a sus colaboradores **Marina Verdú** y **José Luis Marcilla**.

De sus compañeros de Cambridge (Reino Unido), donde Román estuvo investigando varios años, mantuvo una especial amistad con **Leonardo de Arrizabalaga**, **Richard Oliver** y **Ralph Smith**, de quien intentó despedirse por teléfono personalmente en su lecho de muerte, pero no lograron localizarle. Con ellos se reunía a comer cada cierto tiempo.

Durante los estudios de su segunda carrera en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, tuvo una especial relación con algunos de sus nuevos compañeros jóvenes a los que consideraba sus pupilos como son **Maite Gudín** y **Silvano de las Heras** o aquel otro **Juan** (cuyo apellido lamentablemente desconozco) a quien animó y ayudó para que no abandonara la carrera. Durante la realización de su tesis doctoral en Medicina, tuvo una especial relación con **Luis Arráez**.

Seguro que la adquisición de conocimientos médicos con su segunda carrera daría pie a innumerables conversaciones y discusiones sobre sus propios diagnósticos con sus médicos de cabecera con quienes mantenía una fuerte relación de amistad por encima de la simple relación médico-paciente. Estos eran **Manuel Díaz**, **Pedro Sanchidrián** y **Juan Gómez Durán**.

Decía en un lugar anterior que ¡pobre de aquel que no tuviera amigos!. Ante lo que acabo de exponer, no hay duda de que Román fue muy rico.

Una de las cualidades de la amistad es la fidelidad; por eso, Román sufrió mucho cuando se sintió traicionado por un amigo en relación con unas oposiciones. Como contrapunto, aquí puedo volver a hacer referencia a su noble comportamiento para conmigo cuando ingresé yo en esta Real Academia Nacional de Farmacia que he mencionado anteriormente.

Román mantuvo su concepto de la amistad hasta el final de su vida: baste decir que cuando estaba ya hospitalizado en la última fase de su dolencia, llamó con el teléfono móvil para despedirse de muchos de sus amigos, diciéndoles “esto ya es el final”. Él mismo, como médico, se había diagnosticado. Según me han contado sus familiares, estuvo hablando con el teléfono móvil hasta que se agotó la batería. Entonces se durmió y, prácticamente, ya no despertó.

Antes de terminar, quiero agradecer a **Cristina**, hija de Román, y a **Merche**, su hermana, la valiosa ayuda que me han prestado y me ha permitido redactar estas breves, pero muy sentidas, palabras. Por supuesto que pido excusas si he omitido algún nombre que debiera haber figurado entre la lista de personas nombradas. Ese riesgo se corre siempre que se hacen relaciones nominales.

Termino mi intervención diciendo: Román, amigo, descansa en paz.

He dicho.



Román de Vicente Jordana, científico

Rafael Sentandreu Ramón

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Debo primeramente dar gracias a la Junta de Gobierno de nuestra Academia por darme la oportunidad de exponer ante todos Uds. aspectos de “*Román de Vicente Jordana: como científico*”.

Conocí al Dr. Román de Vicente en 1962 con motivo de mi incorporación como becario del Instituto de Microbiología “Jaime Ferrán”, del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Ello fue debido a que por casualidad conocí a uno de los miembros del Instituto que me invitó a visitar el centro. Mi primera visita al CIB me marcó para toda mi vida. Me sorprendió descubrir la actividad inusitada de los becarios más jóvenes, pero sobre todo poder hablar con científicos de prestigio reconocidos que habían completado su formación como investigadores en varios países europeos y en los EE.UU. Me comentaron que el Dr. Román de Vicente había estado investigando por periodos dilatados en la Universidad de Cambridge y que ésta le había concedido el grado de Master of Science en 1957. La Universidad de Cambridge era y es actualmente, según los índices correspondientes, la primera universidad europea en producción científica y la tercera de todo el mundo. Román de Vicente había obtenido previamente el doctorado en Farmacia en 1949 y posteriormente el doctorado en Medicina y Cirugía en el 2003 ambos por la Universidad Complutense de Madrid. Recuerdo la profunda impronta, la marcada huella que me produjo mi entrevista con Román y que aún hoy la recuerdo y leo en mi memoria con toda su intensidad. Obviamente no son mis vivencias las que debo narrar sino centrarme en el homenaje a la memoria de uno de esos científicos que conocí durante el desarrollo de mi trabajo experimental en el CIB: el Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana.

Como seguramente saben Román fue un científico reconocido fundamentalmente por ser el autor de la Teoría de la Función Citoarjé que expondré brevemente a partir de sus publicaciones y, posteriormente, concluiré comentando aspectos de su amplios conocimientos como científico y los múltiples reconocimientos que tuvo fruto de su actividad científica. Debo pedir que al evaluar su actividad científica hagamos, queridos compañeros académicos y amigos todos, un esfuerzo para introducirnos en su momento histórico, en la realidad del tiempo en que desarrolló su Teoría de la Función Citoarjé y no bajo el prisma del conocimiento biológico actual.

El primer concepto de interés descrito en uno de sus trabajos se refiere a su punto de vista sobre:

Dinámica vital en el desarrollo de los microorganismos sobre la materia viva y sobre la materia muerta.

Román nos dice: La vida pasa por una sucesión de acontecimientos y en un momento determinado esa vida cesa. Los cadáveres de plantas y animales forman una materia muerta. Esta observación no se reduce a eso, muy pronto otros organismos comienzan una vida exuberante sobre la materia que fue también viva.

Lo mismo ocurre con los árboles, con el embrión de pollo o con el niño nacido libre de gérmenes que se caracterizan por que, como los microbios, están en periodo de crecimiento. Muchos de estos organismos cuando todavía se encuentran vivos, han respetado e incluso han favorecido su actividad. Y Román se preguntó por qué. Hago un pequeño paréntesis en esta idea que desde mi punto de vista representa un anticipo a nuestra ciencia de hoy como lo demuestra el estudio del microbioma humano.

Román de Vicente, nuestro investigador, no tuvo fácil encontrar el organismo idóneo para intentar demostrar el porqué de estas observaciones. Entre los modelos posibles, la patata le ofreció las condiciones idóneas. Este tubérculo por su gran autonomía, por su extraordinaria sensibilidad a las bacterias de la muerte, por la posibilidad de paralizar o activar su proceso de germinación a voluntad. Y, finalmente, la autonomía de sus brotes, que permite ser fraccionada en dos o más partes y experimentar con cada una de ellas como una sola unidad sin perder el factor individual.

Los tubérculos de patata se pudren en contacto con las bacterias de la podredumbre, específicamente con *Erwinia carotovora*. Por el contrario, la actividad germinativa del tubérculo paraliza la infección. El sistema de defensa no depende de una condición o factor individual del tubérculo, sino de su actividad metabólica.

Podemos controlar la activación o inactivación de un mismo tubérculo y con ello inducir la síntesis del parásito o la síntesis del material del huésped.

Existe, pues, una competencia o interferencia entre la “vida”, la de la patata y la de la bacteria. La razón de la competencia nos dice, ha de encontrarse en los genes.

Recordemos que la hipótesis del citoarje la desarrolló básicamente a partir de la segunda mitad de la década del 50 del siglo pasado, solo unos pocos años después de la aparición en 1953 en la revista Nature del trabajo de Watson y Crik.

El investigador continúa describiéndonos sus observaciones y nos dice: Un fenómeno semejante lo encontramos en crecimiento de las plantas en función de la temperatura, ésta, bloquea el crecimiento de las plantas tropicales en las cumbres heladas, como así mismo la presencia de la aterciopelada flor de las nieves en las llanuras bajas. Esto, que en términos vulgares llamamos aclimatación, se debe posiblemente a la misma causa que se adivina en los resultados obtenidos en la patata. Su conclusión fue que los organismos vivos necesitan un catalizador al que le dio el nombre Citoarjé (Kytos: célula; arjé: dirigir, mandar), es decir, el citoarjé es aquello, el orgánulo, que dirige y manda en una célula.

Román proponía que el citoarjé debería ser responsable de la función necesaria y última de vida de cada especie viviente: la actividad de síntesis del huésped sería responsable de impedir la correspondiente del parásito y viceversa. Y proponía que el citoarjé pudiera ser una familia de nucleoproteínas, cada una de ellas responsables de las características de cada especie biológica y con carácter universal. Esas nucleoproteínas tendrían la propiedad de regular la vida de cada especie e imprimirían su propia identidad que sería modulada en conjunción con los factores del medio ambiente.

El citoarjé engloba, por tanto, un doble carácter en la célula: un citoarjé correspondería a las nucleoproteínas propias de la especie y que se denomina arjesomas, cuya función sería la de dirigir la síntesis normal de la célula. Otro carácter se debería a la presencia en una célula de un simbiote o parásito, éste sería responsable de inducir una disfunción o una síntesis anormal en la célula huésped y que proponía llamarlo arjevirus.

Como podemos deducir por lo descrito, Román de Vicente fue un innovador imaginativo, un modificador de conceptos, un investigador perseverante con ideas originales de las que nunca se achicó porque a la investigación según decía “hay que sostenerla siempre con esperanza, sinceridad y tenacidad”. Debo recordar que con demasiada frecuencia trabajó con una financiación insuficiente y con la incomprensión de sus compañeros, pero fue capaz de superar muchas de esas dificultades.

La idea del citoarjé, que como toda innovación fue controvertida, merece nuestros respetos y atención. Su tenacidad le llevó a acumular un muy importante trabajo experimental en apoyo de su hipótesis. No se amilanó con las dificultades que encontró y prosiguió adelante apoyado en las dos virtudes que destacan en su conducta: la sinceridad experimental y la tenacidad.

Su trabajo científico no se redujo a la experimentación conexas con la teoría del citoarje, sino que con su amplia formación científica llegó a ser un experto en los ambientes científicos de los alimentos, cáncer y medio ambiente.

Finalmente debo enfatizar que no todo fueron obstáculos, como lo demuestran las becas y ayudas recibidas, principalmente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, del Ministerio de Asuntos Exteriores y de la Fundación Juan March; así como premios, entre los que se encuentran el Alonso de Herrera y el Leonardo Torres Quevedo, y el premio de honor de la Academia Internacional de Lutecia en París. Fue numerario de la Academia de Arte y Ciencias de Estocolmo, honorario de la de Medicina de Río de Janeiro y correspondiente de la Sociedad Argentina de Microbiología. Participó en diversos Congresos, fue responsable de la organización de la Primera Reunión de Microbiólogos iberoamericanos, en 1966, de las Jornadas Internacionales de Organización Científica, en 1973, y el Simposio de Genética y Ética, en 1977, y publicó diversos artículos científicos, la mayoría en el extranjero, así como 7 libros y 20 ensayos.

Finalmente pediros que lo recordemos como un científico valeroso, entusiasta, provocador, inconformista, inquieto, rebelde y curioso, pero perseverante, generoso y a la vez exigente, un soñador que no veía gigantes, sino molinos. Y guardemos este recuerdo porque, como él siempre decía, los recuerdos siempre serán nuestros.

He dicho.



Román de Vicente, creyente

Francisco González de Posada

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina y
Correspondiente de la de Farmacia

Román de Vicente, al que hoy recordamos como compañero reconquistado y reintegrado entre nosotros, nos ha dejado a sus bastante felices 95 años. Nos conocimos aquí, en esta Real Academia Nacional de Farmacia. No sé por qué razón, si hubiera existido alguna, me concedió el honor de su amistad, su confianza y su aprecio, ciertamente no lo sé. Román, hijo de **ingeniero de Caminos**, y creo yo que por esta condición, rara en el marco de nuestra academia, al situarme en el ámbito de la profesión que en su juventud era socialmente la más importante en España, facilitó, al menos en primera instancia, que me concediera dichos relevantes dones. De ello pueden dar fe, en primer lugar, su esposa Chelo y su hija Clara; también muchos de vosotros habéis sido testigos de la especial consideración con la que nos destacó. Tenía una especial satisfacción en su pertenencia a la Cofradía Internacional de Investigadores de Toledo y disfrutaba en la ciudad imperial, en los últimos años, de nuestra compañía. Gracias, pues, querida Chelo, y queridos hijos de Román: Marta, Román, Cristina, Juan, Alicia y Clara, la menor, quien nos ha mostrado vuestro deseo de que pronunciara unas *palabras académicas* en recuerdo de vuestro esposo y padre. Y gracias, muchas gracias, ¡cómo no!, Presidente y Secretario de nuestra Real Academia, por la amable solicitud de mi participación en esta sesión necrológica.

En el horizonte del pensamiento, tanto como en su trasfondo humano, pueden situarse tres **niveles de reflexión**: el específicamente **científico** -observación de los hechos y experimentación con y sobre hechos-, el propiamente **racional** -elucubración, que caracteriza a la filosofía-, y el genuinamente **religioso** -apertura a la trascendencia, que se refiere básicamente a las consideraciones de fe-. He dicho bien, tres niveles de reflexión humana, tres. La unitariedad -unicidad- del pensar, reflexionar, construir mentalmente, elaborar conceptos, formular teorías es siempre estructural; entre sus notas más significativas, constituyentes de esa prioritaria unidad, pueden señalarse precisamente las tres citadas en tanto que notas estructurales, notas caracterizadoras del pensar: **ciencia, razón y fe**. La identidad humana integra estas tres notas (claramente identitarias del género humano y distintivas del resto de los seres vivientes). La identidad personal dependerá de cómo, cuándo y cuánto se presente y participe cada una de ellas en la forja de la personalidad de cada humano.

Las características citadas no son independientes entre sí sino que en el seno de la unidad estructural, recordando a Xavier Zubiri, son mutuamente respectivas, en tanto que notas caracterizadoras de la unidad pensante y de la unidad de cada acto pensado. Y asimismo son respectivas las manifestaciones sustantivadas que hemos construido conceptualmente, en elaboraciones intelectuales, para un mejor conocimiento de la realidad, de nosotros mismos y de nuestras relaciones: **ciencia, razón y fe**.

Ciencia, Razón y Fe son ámbitos intelectivos distintos, pero son, sobre todo, y en primer lugar, esencialmente humanos. Y por serlo tienen un soporte y un soportador 'personal' común: la persona humana, en la que coinciden los tres niveles, los tres ámbitos. Y primaria y primordialmente son sólo esto o tanto como esto: caracterizadores de la **identidad humana** en tanto que **coexistentes** en ella.

La **ciencia** moderna consagró dos principios: observación y experimentación de los hechos naturales, frente a la prácticamente sola elucubración. Los hechos, tal como fueran, tales como sean, constituirían su fundamento.

Desde Galileo hasta la actualidad, la **ciencia** es el ámbito más generalmente selecto, respetado, admirado. Tanto su contenido como sus afirmaciones pueden ser refrendadas (o rechazadas) por otros, por los demás, por (casi) todos. Es común. En la Edad Moderna, tras Galileo y Newton, con el refrendo de Kant, se colocó en la cumbre, fue adorada, y con ella y su hija la técnica se alcanzaría el mito -la utopía- del 'progreso indefinido'.

La ciencia es también **razón**. Necesita de la razón para su constitución. Los hechos no hablan por sí solos, precisan de una construcción para su elaboración y establecimiento como tal ciencia, conocimiento científico. A veces se han identificado: razón = ciencia. Así, la ciencia exige de la razón, es fruto de la razón, pero no sólo de ella. Se nutre también de la **imaginación**.

Pero la ciencia es también **fe**. ¡Qué duda cabe acerca de la afirmación de Ortega: "La ciencia es una forma especial de creencia"! Sí, ¡qué duda cabe! Creímos en las que para evitar confusiones me gusta denominar, en libros y exposiciones orales, dinámica newtoniana y teoría newtoniana de la gravitación como dogmas durante dos siglos, pero a principios del siglo XX abandonamos estas creencias por otras -las propias de la Relatividad y la Cuántica- y así entre encuentros y desencuentros de principios científicos hemos transitado el último siglo, sin saber propiamente a qué fe científica

someternos, aunque, esto sí, sabedores de que la ciencia nos seguirá aportando verdad, construyendo conocimiento.

La **razón** es prioritariamente personal, es sobre todo ejercicio, es conocimiento adquirible, establecido y repetido. Sí, es ejercicio; se ejercita. No es propiamente objetiva, común, general, ni tampoco pretende(ría) serlo. Tres adjetivos utilizo con frecuencia a la hora de tratar de este ámbito. Con sólo sus respectivas denominaciones se comprenden los tan dispares usos a que da lugar, por ejemplo: racionalidad teológica, racionalidad científica, ... e incluso la siempre dispersa e incluso antagónica a la que nos tiene acostumbrados la racionalidad jurídica, ...

La **razón científizada** es la suma filosofía, es, por una parte, la Filosofía de la Naturaleza, es Aristóteles, es Newton, es Maxwell; y por otra, la filosofía como método, es Descartes, es Kant, es Husserl, es Bunge.

La **razón religiosa** es teología, la ciencia de la reflexión sobre Dios, acerca de lo sobrenatural, el camino hacia la trascendencia, el pensamiento en el más allá espacio-temporal.

La **fe** es ámbito de las creencias, en el que se depositan unos creeres -pensares asumidos-, de amplio espectro, aunque en el lenguaje ordinario el término 'creyente' se identifique con la pertenencia a un credo religioso.

La **fe científica** se presenta tanto como creencia en la ciencia adquirida como en la esperanza en la ciencia por venir tras el esfuerzo humano continuado en la búsqueda de conocimiento cierto.

La **fe racionalizada**, de diferentes maneras y con distintos credos o contenidos, se formaliza usualmente en los denominados, en el ámbito occidental, Catecismos y Confesiones.

Pero si la conceptualización de estos tres términos lingüísticos -ciencia, razón y fe- en su condición de sustantivos es posible, la separación de los mismos en cuanto notas definidoras de una persona, a la hora de caracterizar su identidad personal, no lo es tanto. La persona es ante todo unitariedad y tras ella, y ella misma, se expresa mediante las notas estructurales. Todos, de diferentes maneras, somos simultáneamente científicos, racionales y creyentes.

Hemos oído glosar la figura de **don Román de Vicente**, la del amigo, la del académico, la del investigador. Aquí nos referimos directamente a los términos que estoy utilizando: ciencia, razón, fe. Verdad (casi) objetiva sólo es posible en la ciencia, pero la vida de un humano precisa y exige de los tres ámbitos.

La identidad personal de Román de Vicente se manifiesta, sobre todo y ante todo, como **hombre de fe**, de convicciones, de creencias. Éstas, con sustratos en la ciencia y por vía de la razón, se muestran **firmes** en la memoria y ancladas en la voluntad. En él, de ordinario, no deambulaban con las dudas propias del quehacer intelectual que está con harta frecuencia dedicado a la búsqueda y no regodeándose en lo ya encontrado, lo establecido que usualmente satisface.

La nota de fe adquirió un valor superior en Román. Inundó su hacer y su pensar en ciencia, donde demostró, en actitud de creyente, sus 'descubrimientos' fueran o no propiamente adquiridos con metodología tradicional científica o por personal racionalidad.

Su fe era excelsa, sublime, excesivamente grande, en contraste con un mundo actual caracterizado bien por el dominio de la increencia, bien por el del relativismo -en consonancia con el cientifismo y el racionalismo-, significado mediante la expresión "todo vale".

La vivencia -la convivencia- con un **hombre de fe, firme**, inflexible, es de ordinario difícil. Pero, sin duda, enriquece, a todos los del alrededor.

Román, creyente, sí, en la fe cristiana católica apostólica romana.

Román, creyente en sí mismo. ¡Y con qué firmeza! ¡Con qué seguridad!

Román, creyente también en 'su' ciencia, la mixtura observación-construcción personal, con el valor y la dificultad de 'hacer la suya' -su ciencia- y, a la vez, de 'hacerla suya'.

En nuestra Real Academia Nacional de Farmacia debemos señalar que el Dr. Román de Vicente fue creyente en sus observaciones, creyente en su razonar, creyente en su obra científica. Pero también que fue creyente en su Dios, y creyente en sí mismo. Así era, y se manifestaba, feliz, seguro, en posesión de la verdad, de las respectivas verdades, de las suyas. Y así lo admirábamos y lo temíamos, y lo respetábamos.

Manifestación de **fe científica y racional**, al modo de la modernidad, en que el hombre por sí mismo, por su razón, constituye la máxima de referencia. Pero este hombre ha sucumbido, dejado de ser, en la postmodernidad. El *perspectivismo* ortegiano propio de la realidad tanto o más que de nuestra respectividad en la dualidad persona-realidad, ha transitado a lo largo del siglo XX hacia el *relativismo* de las creencias básicas y de las conductas morales. Román se mantuvo firme en su fe racional, fiel en su racionalidad moderna.

Su **fe religiosa** cristiana católica apostólica romana, firme en sí, no le impedía respetar otras manifestaciones de fe, quizás en actitud recibida en su contacto con el mundo científico británico. Esta convicción la ponía de manifiesto con suma satisfacción al difundir la idea de que la Cofradía Internacional de Investigadores de Toledo admitía en su seno a los creyentes en 'un único Dios personal' y con esta actitud asistía todos los años a los actos conmemorativos de la investidura de nuevos cofrades en San Juan de los Reyes y en la procesión del Corpus Christi, jornada ésta la más significativa de la manifestación popular anual de la ciudad imperial. Creyente, pues, respetuoso con las creencias ajenas, al menos en el marco de la conquista histórica de la filosofía occidental de raíz judeo-cristiana basada en la racionalidad filosófica de que si existe dios ha de ser único, como expresan, al margen de sus disputas históricas y de las barbaridades cometidas en su

nombre, todas ellas.

Hombre de fe, fe religiosa en el Dios uno y trino católico, fe en sí mismo, fe en su ciencia y en su obra científica siempre a punto de concluirse, fe un su sistema de razón. Y se nos ha ido y con él se ha llevado su singularidad: su firmeza y su constancia, su seguridad y sus esperanzas. Hoy descansa en la paz que le ofrecieron su manifiesta seguridad, su razón, su ciencia, su Dios.

En el mundo actual caracterizado según los más relevantes **filósofos sociales** (transcurridas las épocas de modernidad y postmodernidad) por la *postverdad*; según los **teólogos morales** por el *relativismo* de los principios y de las conductas; según los **psicólogos sociales** por la *pérdida de valores*. Es precisamente en este mundo y para este mundo en su actualidad cuando podemos mirar a nuestro compañero que, en esta conmemoración de su recuerdo y en su homenaje, ahora nos contempla y en nuestro mirarlo, descubrir de alguna manera la necesidad de cierta tendencia en los que aquí seguimos de buscar en lo absoluto, regresar a la verdad, objeto primordial de la ciencia, de la filosofía y de la teología, y a recuperar valores perdidos.

A nuestro compañero Román de Vicente: Descansa en paz.



Sesión Inaugural del Curso Académico 2018
Orden del Día

1. Salutación del Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.
2. Memoria de Secretaría, comprensiva de la labor Académica en el año 2017 por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas.
3. Protocolo de Toma de Posesión del Excmo. Sr. D. Jesús J. Pintor Just, Académico Secretario Electo.
4. Lectura del discurso reglamentario por el Excmo. Señor, Antonio Luis Doadrio Villarejo, Académico de Número, titulado «*Un mundo extraño. El universo microscópico, partículas cuánticas y átomos*».
5. Entrega de Placas de agradecimientos a los Académicos de Número.
6. Entrega de Diplomas acreditativos a los Socios Colaboradores Farmacéuticos
7. Entrega de Premios del Concurso Científico 2017.
8. Clausura del Acto

DISCURSO DE APERTURA DEL CURSO ACADÉMICO DE LA RANF, 18 DE ENERO DE 2018

Mariano Esteban Rodríguez

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Excmo. Sr. Presidente de la Real Academias de Farmacia de Cataluña, Excmos. Sras. y Sres. Académicos, Autoridades, Sras. y Sres.

En primer lugar quiero manifestar mi pesar por aquellos académicos de número que nos han dejado, los Excmos. Sres. D. Manuel Ortega Mata y D. Julio Rodríguez Villanueva, figuras señeras de esta Real corporación y cuyas enseñanzas profesionales y científicas han dado prestigio a esta Academia; además, sabiendo que su gran labor permanecerá siempre y seguirá transmitiéndose a través de sus discípulos. Así también, el pésame por los Académicos correspondientes que nos han dejado, los Ilmos. Sres. D Enrique Villar Ledesma y el japonés Tadashi Goino.

Con la responsabilidad y el honor que me otorga haber sido nombrado Presidente del Instituto de España, corporación que aglutina a las diez Reales Academias, me corresponde transmitir a la sociedad la importante labor que las Reales Academias vienen ejerciendo en España y fuera de nuestras fronteras. Es pues nuestra responsabilidad el colaborar estrechamente con las instituciones públicas y privadas, así como ayudar al gobierno de la nación en los asuntos que nos son propios y que pueden facilitar la toma de decisiones en temas como la sanidad, farmacia, educación, nuevas tecnologías, y todo lo relacionado con la ciencia e innovación. Por ello ya en 2016 las Reales Academias manifestaron la necesidad de un Pacto de Estado por la Educación, con la finalidad de establecer criterios homogéneos en la educación de nuestros jóvenes, a través de un consenso generalizado entre Comunidades Autónomas y nuestros representantes políticos en el Congreso de los Diputados y Senado. Actualmente consideramos la necesidad de establecer un Pacto de Estado por la Sanidad, acción que la RANF viene potenciando en estrecha colaboración con ASEDEF (Asociación Española de Derecho Farmacéutico) a través de sesiones a lo largo de 2017, que continuarán en 2018, con seminarios presentados por expertos y cargos públicos sobre los temas sanitarios que nos preocupan a todos, con la finalidad de encontrar puntos de encuentro que unan y buscar soluciones donde puede haber discrepancias. Además, desde las Reales Academias apoyamos las iniciativas encaminadas a potenciar la capacidad de nuestro país en el desarrollo y aplicación de las ciencias y tecnologías experimentales que están dando un gran impulso y permitiendo a los países un mayor desarrollo económico. El tema por conocido y repetido es que “sin ciencia no hay futuro” y en este ámbito debemos de esforzarnos para que España esté en el lugar que le corresponde como nación. Tenemos a la generación de jóvenes científicos mejor formada de la historia, muchos de ellos en el extranjero, y debemos de establecer cauces para conseguir su retorno e incorporación al sistema productivo de I+D+i, a la

vez que fomentar una carrera científica en el país. Por ello hay que incrementar la inversión actual del 1.19% del PIB en I+D+i, menos que hace una década, para dinamizar el desarrollo científico y tecnológico de España. Los países más fuertes y eficientes de Europa han aumentado drásticamente sus inversiones en I+D. Este es un aspecto donde creo convergen todos los partidos políticos, por lo que se debería entre todos impulsar un Pacto de Estado por la Ciencia y la creación de un Ministerio propio. Sólo quiero desde esta tribuna resaltar nuestras obligaciones como Reales Academias, y enfatizar que cuentan con un plantel de excelente expertos que en el momento álgido de la vida aportan un gran bagaje de conocimiento en aras del progreso de nuestro país.

Como “obras son amores y no buenas razones”, me corresponde como Presidente de la RANF hacer una breve sinopsis de lo que hemos realizado a lo largo del curso 2017, aunque los detalles del mismo serán expuestos por nuestro Secretario Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, al que quiero expresar mi enorme agradecimiento por su generosidad y magnífica labor prestada a la Academia durante sus 6 años como Secretario de esta corporación, y cuyo mandato termina hoy.

Vayamos en primer lugar a considerar los avances mundiales del año 2017 mas importantes en ciencias de la vida. Así la revista Science describe, que en 2017 sobresale el desarrollo de dos técnicas relacionadas con la herramienta de edición genética CRISPR/Cas: una se dirige al ácido de ribonucleico (ARN), sin modificar el genoma de manera permanente, y la otra desarrolla un nuevo "editor de bases". He de resaltar la aportación en el descubrimiento de CRISPR por el científico español Francisco Mojica de la Universidad de Alicante, que ha merecido ser considerado entre los candidatos al Premio Nobel. Otro avance fue la decisión de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE.UU. de aprobar un nuevo tratamiento contra la leucemia, que es la primera terapia génica contra el cáncer. También este año, el avance sobre la criomicroscopía electrónica le valió este el Nobel de Química al suizo Jacques Dubochet, al germano-estadounidense Joachim Frank y al británico Richard Henderson. Se trata de un método efectivo "para generar imágenes tridimensionales de las moléculas de la vida", con lo que ayudará a comprender mejor enfermedades como el cáncer o el Alzheimer, y cuya aportación fue presentada en la RANF en la sesión de los Premios Nobel. Por último, la revista Science incluye un trabajo del Nationwide Children's Hospital en Columbus (EE.UU.) y la compañía Avexis con terapia génica, cuyos científicos pudieron salvar la vida de bebés que nacieron con una enfermedad neuromuscular al agregar un gen que faltaba en sus neuronas espinales. También se han producido este año avances espectaculares en el campo de las vacunas. Por ejemplo, los científicos han probado ya con éxito dos nuevos tipos que previenen enfermedades con mucho impacto en la población como el tífus y el zika.

¿Que es lo que hemos realizado a lo largo de 2017?. De nuevo, hemos llevado a cabo, gracias al esfuerzo solidario de todos los Académicos de la RANF y de aquellos que generosamente han participado en las distintas actividades realizadas en la Academia, una intensa actividad. Hemos establecido un record absoluto de actividad con un total de 55 actos, siendo destacables las tomas de posesión como académicos de Número de las Excmas. Sras. Dña. Yolanda Barcina Angulo y Dña. Mercedes Salaíces Sánchez, y la del Académico de Honor, Excmo. Sr. D. Pedro Guillén García. Así como también, las tomas de posesión de ocho Académicos Correspondientes extranjeros, repartidos entre el Reino Unido, Alemania, Francia, Portugal, Perú y EE.UU, lo que representa la proyección hacia el exterior y colaboración internacional de la RANF. También hay que destacar las conferencias, mesas redondas, tertulias, simposios, presentación de libros, sobre temas de gran interés científico, sanitario y social, como regulación de medicamentos, inmunoterapia del cáncer, nanopartículas como portadoras de fármacos, microbiota intestinal, enfermedades cardíacas, secuenciación masiva, fármacos biosimilares, el cerebro, ingeniería biomédica, energías renovables, medio ambiente, oportunidades terapéuticas del RNA, vacunas del adulto, resistencias a los antimicrobianos y mas temas que serán descritos en la presentación del Secretario. Muchas de estas actividades han sido patrocinadas por la Fundación Casares Gil de amigos de la RANF. También quiero destacar el éxito de las actividades llevadas a cabo por las dos cátedras ya consolidadas, como la cátedra Juan Abelló (Tratamiento del dolor) y Pedro Guillén (Medicina regenerativa) con extraordinarios ponentes y presentando grandes avances de cómo la investigación está aportando un gran bagaje de conocimiento para la mejora en la salud de los ciudadanos del mundo. La transmisión de todas estas actividades no son solo presenciales sino que se promocionan también a través de su difusión vía portal TV-RANF con alcance a los países latino-americanos, redes sociales como Twitter y en las publicaciones a través de la revista Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Esta actividad divulgadora se ha visto ampliada en este curso gracias al acuerdo de colaboración con el grupo SANED para el desarrollo de actividades formativas e informativas, como artículos por nuestros académicos en la revista Aula Farmacéutica que llega a unos 12.000 farmacéuticos comunitarios. Para incrementar la finalidad divulgadora de las ciencias farmacéuticas, hemos establecido un convenio de colaboración con la Fundación Ramón Areces, que se distingue por su apoyo y proyección de la ciencia en todas sus vertientes. También para potenciar la formación de personal sanitario y profesionales farmacéuticos, hemos realizado tres cursos, sobre inmunonutrición, obesidad y anti-concepción, todos ellos impartidos por académicos y expertos invitados.

¿Que retos se nos presentan en el 2018?

De hecho el calendario con el programa de actividades está casi al completo, con tomas de posesión de Académico de Número, Académicos Correspondientes, conferencias, mesas redondas, tertulias y cursos, entre otras actividades. Intentamos presentar en la Academia temas de gran importancia para el sector farmacéutico y la sociedad.

La colaboración entre Reales Academias es otro de nuestros retos. Precisamente celebramos en noviembre de 2017 el cuarto encuentro entre Reales Academias que agrupan a las Academias de Ciencias, Medicina, Ingeniería y Farmacia, sobre “nanotecnología”, con la finalidad de estrechar vínculos de unión y debatir temas que requieren multi-disciplinariedad, algo necesario en el mundo actual para el desarrollo óptimo de la investigación biomédica. En el mismo mes de 2018 celebraremos el quinto encuentro. Además queremos ampliar esta colaboración entre Reales Academias por lo que celebraremos en los meses de mayo-junio de 2018 un encuentro entre las 10 reales academias del Instituto de España sobre un tema como el “Cerebro y Creatividad”, con el fin de abordar desde distintos frentes esa parte fundamental del ser humano que nos predispone a ser creativos en todas las áreas del conocimiento. También celebraremos en la sede de la RANF el quinto encuentro entre las Reales Academias de Farmacia y Medicina con la Comisión Mixta de Sanidad del Congreso de los Diputados y del Senado para debatir temas sanitarios de interés común, como continuación de los anteriores encuentros, y dirigido a que exista un mayor conocimiento de lo que las Reales Academias pueden aportar a los representantes políticos en la elaboración de las leyes que afectan al sector sanitario. También celebraremos en la RANF, octubre de 2018, la inauguración del curso académico de las Reales Academias bajo la presidencia de su Majestad el Rey Felipe VI.

La generación de recursos propios es otro de nuestros retos para mantener el alto nivel en las actividades científicas que se desarrollan en nuestra Academia. Estos recursos tan necesarios provienen de las aportaciones generosas de empresas farmacéuticas, asociaciones profesionales, fundaciones, inscripciones como Socio Colaborador RANF, a lo que animo a todos ustedes a hacerse socios, y del alquiler de salas. En esta dirección hemos establecido un acuerdo marco con Mediaset para el rodaje de una serie televisiva.

No quiero terminar este discurso sin el reconocimiento a los Académicos de la RANF que han sido distinguidos con premios y distinciones a su labor investigadora y a todos aquellos que han participado en las distintas actividades de la Academia. También, a la Junta de Gobierno, Secciones, Comisiones y Junta General por todo su apoyo, que han hecho fácil para este servidor su función como Presidente. A todos mi agradecimiento. Quiero extender este agradecimiento al personal administrativo de apoyo, que aunque pocos en número, realizan con gran dedicación sus actividades profesionales.

A todos ustedes, y a los académicos que no pueden estar con nosotros pero que los recordamos con cariño, os deseo buena salud y felicidad para este Nuevo Año 2018, he dicho

MEMORIA DE SECRETARÍA CURSO 2017

Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia



Excmo. Sr. Presidente de la Real Acad. Nal. de Farmacia D. Mariano Esteban; Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales D. José Elguero, Excmas. Sras. y Sres. Académicos, Dras. y Dres. Premiados, familiares, Sras. y Sres. y amigos.

Esta Real Academia Nacional de Farmacia, bajo la dirección de su Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez, inició las actividades del Curso Académico 2017 el 12 de enero, comenzando con el Funeral por los Académicos fallecidos en la Iglesia de San Ildefonso de Madrid. Tras su celebración, y a las 19 horas, dio comienzo la Solemne Sesión Inaugural, acompañados en la mesa de presidencia, por el Presidente y Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina de España, los Excmos. Sres. D. Joaquín Poch Brotó, y D. Luis Pablo Rodríguez Rodríguez.

Tras unas palabras de salutación de nuestro Presidente, el Académico Secretario que les habla, procedió a la lectura de la Memoria de Secretaria del año 2016. Y a continuación, la Académica de Numero, Dña. M^a Teresa Miras Portugal dio lectura al discurso reglamentario, titulado: LAS CÉLULAS GLIALES: SU IMPORTANCIA EN EL FUNCIONAMIENTO, DESARROLLO Y REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO. Intervenciones todas ellas, publicadas “in extenso” en la revista Anales, de esta Real Academia.

A continuación se procedió a la entrega de las Medallas Carracido en su Categoría Oro, a favor de la Académica de Número Dña. María Cascales Angosto; y de Plata a la Correspondiente Dña. Carmen de la Rosa Jorge.

Seguidamente, fueron entregadas Placas en agradecimiento por los servicios prestados, a algunos Académicos que han llevado acabo cargos y trabajos específicos para la RANF. La Sesión finalizó con la entrega de los Premios del Concurso Científico 2016.

“IN MEMORIAM”

Esta Corporación comunicó en su día con tristeza, la irreparable pérdida por fallecimiento el pasado año, de los Excmos. Sres. Académicos de Número, D. Manuel Ortega Mata y D. Julio Rodríguez Villanueva; y de los Correspondientes, D. Enrique Villar Ledesma y el Académico correspondiente extranjero D. Tadashi Goino, de Japón.

Con tristeza mencionamos que durante el pasado año, tuvo lugar una Sesión Necrológica en memoria de nuestro compañero Académico y amigo D. Román de Vicente Jordana, en la que intervinieron los Académicos D. Juan Ramón Lacadena Calero; D. Rafael Sentandreu Ramón y D. Bartolome Ribas Ozonas.

ACTIVIDADES CIENTÍFICAS

La intensa y relevante actividad científica de esta Real Academia, tuvo lugar con 55 sesiones, contando con importantes Conferencias, Mesas Redondas, Tertulias Científicas y además 3 Cursos de formación y especialización, en colaboración siempre con la Fundación Casares Gil, de amigos de esta Academia, y en numerosas ocasiones, con: otras Reales Academias, Universidades, laboratorios farmacéuticos y Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid.

Uno de los principios prioritarios de esta Real Academia, es, la difusión de la ciencia y del conocimiento para la formación de la juventud universitaria y científica, así como hacer llegar sus avances a la sociedad. Esta Academia es, una de las instituciones de mayor nivel y prestigio científico de España. Como muestran las felicitaciones recibidas de profesores, científicos y alumnos, que utilizan para su estudio y másteres, las conferencias transmitidas en directo por RANF-TV, y colgadas en nuestra página Web. También lo logramos a través de los distintos Convenios activos, con las 4 Universidades del Área de Madrid, el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, COFARES, Merck, Sharp and Dohme, Lilly, Editorial SANED, y con la Fundación Ramón Areces. Estos dos últimos firmados durante este año 2017.

INCORPORACIÓN DE NUEVOS ACADÉMICOS

Como Académico de Honor tomó posesión el *Académico. D. Pedro Guillén García*, Director de la Clínica CEMTRO, de excelencia de la Federación Mundial de Fútbol; Decano honorario y Profesor de Medicina del Deporte, de la Universidad Católica de Murcia.

Como Académicas de Número tomaron posesión de la Medalla nº 31, la Profesora Dña. Yolanda Barcina Angulo, Catedrática de Nutrición y Bromatología de la Universidad Pública de Navarra; y de la Medalla nº 3, la Profesora Dña. Mercedes Salaices Sánchez, Catedrática de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y como Académicos Correspondientes Extranjeros, tuvieron lugar ocho incorporaciones: de Portugal tomaron posesión: el Dr. Fernando Ramos, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Coimbra, El Dr. Rogério Gaspar, Vicerrector y Catedrático de Universidad de Lisboa, Y la Profa. Cristina Branquinho, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Lisboa. Del Dr. Alain Li Wan Po, Director del Center for Evidence-Based Pharmacotherapy, Nottingham, Inglaterra. Del Dr. Frits Kamp, de la Ludwig-Maximilian-Universidad de Munich, Alemania. De la Profesora Liliane Grangeot-Keros, Secretaria adjunta permanente de la Academia Nacional de Farmacia de Francia; y responsable del Centro Nacional de la Organización Mundial de la Salud de referencia para la Rubéola, en Francia. Del Prof. Adolfo García Sastre, del Department of Microbiology and Fishberg Professor, School of Medicine, del Mount Sinai Hospital, de New York. Y del Prof. José Juárez Izaguirre, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Marcos de Lima, Perú.

CONFERENCIAS

Organizadas por las diversas Secciones, sobre temas de actualidad.

-Con el título: “Nanopartículas mesoporosas de sílice como portadoras de fármacos”, impartida por la Académica Dña. María Vallet Regí.

-Título: “La micorbiota intestinal y su relación con la obesidad” a cargo del Académico D. César Nombela Cano.

-Con el título: “La Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios y otras instituciones encargadas de la regulación de los medicamentos” la conferencia del Dr. Ramón Palop Bauxauli, Director de la Unidad de Soporte de dicha Agencia del Medicamento y Productos Sanitarios, presentado por el Académico D. Bartolomé Ribas Ozonas.

-Con el título “Nuevos genes implicados en el origen de las arritmias cardíacas” a cargo de la Académica Correspondiente Dña. Eva Delpón Mosquera, presentada por nuestro Presidente y del Instituto de España, D. Mariano Esteban Rodríguez.

-“La ingeniería biomédica y su influencia en el desarrollo del homo sapiens” impartida por D. Carlos Atienza Vicente, del Instituto de Biomecánica, de la Universidad Politécnica de Valencia, y presentado por nuestro Académico D. Rafael Sentandreu Ramón.

-“ERC ten years alter” pronunciada por D. José Labastida, Director, en el European Research Council, presentado por nuestra Académica Dña. María Vallet Regí.



-“La nueva tecnología de secuenciación masiva en tripanosomátidos” a cargo del Académico Correspondiente. D. Vicente Larraga. Presentado por el Académico D. Antonio Ramón Martínez Fernández.

-“Biosimilares: Experiencia en la aproximación de un grupo farmacéutico español a la biotecnología” a cargo de D. Enrique Ordieres, Presidente de los Laboratorios CINFA, presentado por el Académico D. Antonio Monge Vega.

-“La droga milagrosa. Aspectos sociales, técnicos y económicos, relativos a la introducción de la penicilina en España (1944-1959)”, pronunciada por el Académico Correspondiente D. Antonio González Bueno, presentado por el Académico de Número y de la Real Academia de la Historia D. Javier Puerto Sarmiento.

-“Problemas imprevistos en salud y medioambiente derivados del uso generalizado de las energías renovables: Un reto a resolver”. Impartida por el Académico Correspondiente D. Eduardo Costas Catedrático de Genética en la Facultad de Veterinaria de la UCM, presentado por nuestra Académica de Número Dña. María Teresa Miras Portugal.

CICLO "LOS VALORES DE LA HISTORIA" con la conferencia titulada “CARLOS III Y LA BANDERA DE ESPAÑA” Moderada por nuestro Académico y de la Real Academia de la Historia D. Francisco. Javier Puerto Sarmiento, patrono de la Fundación de Ciencias de la Salud y que contó con la ponencia de D. Hugo O’Donnell y Duque de Estrada, Duque de Tetuán y miembro de la Real Academia de la Historia.

“EL SINUOSO CAMINO TRASLACIONAL DE LA INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER”, en colaboración con la Facultad de Farmacia, San Pablo CEU, a cargo del Dr. Ignacio Melero Bermejo, Codirector del Servicio de Inmunología e Inmunoterapia. Clínica Universidad de Navarra. Investigador del Centro de Investigación Médica Aplicada(CIMA).

TERTULIAS CIENTÍFICAS

Tuvieron lugar 2 tertulias científicas presentadas por nuestro Académico de Número D. Antonio Ramón Martínez Fernández.

-Sobre “El cerebro. ¿Somos sólo estímulos eléctricos?”, que nos deleitó con su charla, nuestro Académico de Número D. Rafael Sentandreu Ramón.

-Y la segunda sobre “Memoria Histórica de la Industria Farmacéutica en España (1936-2008)”, que disertó el Académico Correspondiente D. Federico López Mateos, Ex Rector y Catedrático de Química Industrial y Economía de Empresa.

MESAS REDONDAS

Tuvieron lugar con los títulos y conferenciantes siguientes:

Sobre “SUELO, PLANTA, CONTAMINACIÓN Y SALUD” Coordinada por nuestro Presidente y del Instituto de España D. Mariano Esteban Rodríguez. Fue presentada por la Académica correspondiente Dña. M^a del Rosario de Felipe Antón, y contó con las siguientes ponencias: del Dr. D. Ramón Carpena, Catedrático del Departamento de Química Agrícola de la UAM, con el título; “Estrategias verdes contra la contaminación de

suelos”. Y del Dr. D. José Javier Pueyo, Profesor de Investigación del Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC, que disertó sobre: “Bacterias y plantas trabajando juntas por el medio ambiente: la simbiosis Rhizobium-leguminosa”.

Otra sobre "PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS: EVIDENCIA CIENTÍFICA", que tuvo lugar en colaboración con la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos. Presentada por el Académico de Número de la RANF, D. Francisco José Sánchez Muniz y moderada por la Académica Correspondiente Dña. Ascensión Marcos, Vicepresidenta de la SEPyP y Presidenta del ISIN (CSIC). Contó con las ponencias de: D. Guillermo Álvarez-Calatayud, del Hospital Materno-Infantil Gregorio Marañón y Presidente de SEPyP: “Aplicaciones clínicas de los probióticos”; D. Juan Miguel Rodríguez, del Equipo PROBISEARCH en la Facultad de Veterinaria de la UCM: “Probióticos para el tratamiento y prevención de las mastitis durante la lactancia”; y Dña. Teresa Requena, del Centro de Investigación en Alimentación del CSIC: “Prebióticos y su impacto en la microbiota intestinal”.

Otra sobre “CIENCIA, POLÍTICA Y FARMACIA EN LA ESPAÑA DEL SIGLO XX: ENTRE GIRAL Y ALBAREDA”. Presentada y Coordinada por Dña. Rosa Basante Pol, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Con la actuación de los ponentes: D. Antonio González Bueno, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia: “José Giral Pereira (1879-1962), acerca de Ciencia y Política. José Giral Pereira, de Francisco Javier Puerto Sarmiento”; y D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, Académico de Número de las Reales Academias Nacional de Farmacia y de la Historia: “José María Albareda Herrera (1902-1966), en torno a la publicación Ciencia y Farmacia en el franquismo: el Club Edaphos, vivero de investigadores en tiempos de José María Albareda, de Guillermo Reparaz, Rosa Basante Pol y Antonio González Bueno”.



Sobre "INMUNOONCOLOGÍA, BIOMARCADORES AVANCES RECIENTES EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER". Presentada por D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y del Instituto de España y D. Raimundo Pérez- Hernández y Torra, Director de la Fundación Ramón Areces. Actuó como coordinador el Excmo. Sr. D. Honorio Carlos Bando, Prof. Honorario de la Facultad de Medicina UAM y Académico Correspondiente de la RANF. Intervinieron como ponentes: el Dr. Alfredo Carrato, Catedrático y Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Ramón y Cajal; la Dra. Pilar Garrido, Jefa de Sección de Oncología Médica y Presidenta del Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud; y la Dra. Pilar García-Alfonso, Jefe Sección Oncología del Hospital Gregorio Marañón. Clausuró el acto D. Mariano Esteban Rodríguez, nuestro Presidente y del Instituto de España.

Sobre “RESIDUOS, CONTAMINACIÓN Y SALUD AMBIENTAL (2ª parte)”, bajo la Presidencia de D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y coordinada por D. Bernabé Sanz Pérez, Académico de Número de la RANF. Actuaron como ponentes D. Francisco González de Posada, Académico de Número de la RANM y Correspondiente de la RANF, con el título “La problemática actual del agua en el mundo” y D. Juan Miguel Rodríguez Gómez, Catedrático del Área de Nutrición y Bromatología

de la UCM y miembro de la Junta Directiva del Instituto Madrileño de Estudios Avanzados, con el título “Contaminantes ambientales con actividad endocrina”.

Sobre el "DÍA INTERNACIONAL DE LA MALARIA" con la colaboración de la Universidad San Pablo CEU. Presentaron el acto D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y del Instituto de España, y la Dra. Beatriz de Pascual-Teresa Fernández, Académica Correspondiente de la RANF y Decana de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU-San Pablo. Con las intervenciones de D. Antonio Ramón Martínez Fernández, Académico de Número de la RANF, con el título “Paludismo, ¿una amenaza menguante?”; la Dra. Laura Sanz Alonso, Biology Manager del Instituto Glaxo,Smith&Kline, de Tres Cantos, Madrid: "Descubrimiento de nuevos fármacos antimalaria: nuevas soluciones para una vieja enfermedad"; y el Dr. Ruprecht Schmidt-Ott, Director Scientific Affairs and Public Health, Europe, de la Glaxo,Smith&Kline Vaccines Wavre, Bélgica: "RTS,S/AS01. the journey towards a malaria vaccine".



Sobre “LA CIENCIA DE LAS ADICCIONES. ASPECTOS CLÍNICOS Y SOCIALES: MALTRATO INFANTIL Y TRASTORNOS POR USO DE ALCOHOL. UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL”, presidida por D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y coordinada por D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, Académico de Número de la RANF. Actuaron como ponentes: el Dr. Gabriel Rubio Valladolid, Jefe de Sección, Servicio de Psiquiatría, Hospital Universitario 12 de Octubre y Profesor Titular del Departamento de Psiquiatría en la Universidad Complutense de Madrid: “¿Qué tipo de maltrato infanto-juvenil puede predecir la aparición de trastornos por uso de alcohol?. Un estudio prospectivo durante 4 años de seguimiento”; y el Dr. Jorge Manzanares Robles, Catedrático de Farmacología, Universidad Miguel Hernández, Instituto de Neurociencias-UMH-CSIC: “Efecto del abandono maternal como método de maltrato en roedores y vulnerabilidad por la aparición de trastornos de la conducta y consumo de alcohol”

Sobre “POSIBLE PAPEL DEL MICROBIOMA EN EL EJE CEREBRO-INTESTINO”. Presentada y Coordinada por Dña. Ana María Pascual-Leone Pascual, Académica de Número de la RANF. Actuaron como ponentes: D. Rafael Sentandreu Ramón, Académico de Número de la RANF, actualmente Prof Emérito de la Universidad de Valencia: “El hombre y los microorganismos: el eje cerebro/intestino” y D. Sebastian Cerdán García-Esteller, Académico de Número de la RANF: “Regulación directa de la actividad hipotalámica por la microbiota intestinal detectada mediante Imagen y Espectroscopia de Resonancia Magnética”.

Sobre: “NANOSISTEMAS MESOPOROSOS POLIVALENTES PARA ENFERMEDADES DE HUESO”. Presentada y coordinada por Dña. María Vallet Regí, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Participaron como ponentes: el Dr. Alejandro Baeza García, Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia. UCM: "Nuevas estrategias para el diseño de nanotransportadores selectivos en terapia antitumoral"; la Dra. Montserrat Colilla Nieto, Prof. Titular Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia. UCM: "Nanosistemas mesoporosos selectivos con capacidad estímulo-respuesta para terapia antitumoral"; la Dra. Isabel Izquierdo Barba, Departamento de Quí-

mica Inorgánica y Bioinorgánica en la Facultad de Farmacia. UCM: "Nuevas estrategias para el diseño de nanotransportadores en el tratamiento de la infección ósea"; el Dr. Miguel Manzano García, Prof. Titular del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica en la Facultad de Farmacia. UCM: "Nanosistemas mesoporosos polivalentes para el tratamiento de osteoporosis"; y la Dra. Blanca González Ortiz, Prof. Titular del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. UCM: "Nanosistemas mesoporosos polivalentes para el tratamiento del cáncer".

Como todos los años, se celebró la MESA REDONDA CONMEMORATIVA DE LOS PREMIOS NOBEL 2017 EN FISIOLOGÍA O MEDICINA Y EN QUÍMICA, coordinada por el Académico de Número D. Juan Ramón Lacadena Calero: "Genética y reloj biológico" "Regla de oro de la investigación biológica: la pregunta, el material biológico, la técnica"; y en la que intervinieron, para el PREMIO NOBEL 2017 EN FISIOLOGÍA O MEDICINA, D. Albino García Sacristán, Académico de Número RANF, con el título: "Ritmos circadianos: importancia del ciclo luz-oscuridad en reproducción". Y sobre el PREMIO NOBEL 2017 EN QUÍMICA, intervino el Dr. D. José María Valpuesta Moralejo, del Departamento de Estructura de Macromoléculas, Centro Nacional de Biotecnología: con el título. "Criomicroscopía electrónica: de la biología descriptiva a la biología estructural".

Sobre "RNA Y OPORTUNIDADES TERAPÉUTICAS" presentada por el Académico de Número D. José Miguel Ortiz Melón y contó con las siguientes ponencias, la de D. José Miguel Ortiz Melón, Prof. Emérito de la Universidad de Cantabria y Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia: "DNA basura y el proyecto ENCODE". D. Javier León Serrano, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Vicerrector de la Universidad de Cantabria, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, disertó sobre: "La transcripción de genes como diana terapéutica dirigida"; y D. José Carlos Rodríguez Rey, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cantabria, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia: "RNAs de interferencia ¿los medicamentos del futuro?".

Sobre "APORTACIÓN DE LOS HONGOS A LA SALUD", presentada por el Presidente de la RANF D. Mariano Esteban Rodríguez, y del Instituto de España y Coordinada por el Académico D. Bartolomé Ribas Ozonas, Académico Secretario de la misma, quien disertó acerca del "Interés de los hongos como medicamentos", y como ponentes: la Dra. M^a Asunción Peiré García, Centro de Medicina Familiar de Barcelona: "Aspectos Farmacológicos de los hongos medicinales"; y el Prof. Dr. Pere Gascón, Catedrático de la Facultad de Medicina de Barcelona, Director Laboratory of Molecular & Translational Oncology-CELLEX; y de la Real Academia de Medicina de Cataluña, Barcelona, con el título: "Micoterapia en Oncología".

Mencionamos también las importantes dos Mesas Redondas donde los miembros de la Comisión de Aguas Minerales y Minero-medicinales, que preside nuestra Académica Dña. María del Carmen Francés Causapé, expusieron trabajos sobre el BALNEARIO DE PARACUELLOS DE JILOCA. de Zaragoza. Esta Academia estudia cada año un Balneario en sus diferentes vertientes, bacteriológica, mineral, física radioactiva, ecológica, botánica medioambiental, y geográfica.

JORNADAS CIENTÍFICAS

Tuvieron lugar toda una serie de jornadas científicas y reuniones diversas con diferentes instituciones, Academias, Laboratorios farmacéuticos, y en la Cámara de Diputados.

La primera sobre "VACUNAS DEL ADULTO", en colaboración con la empresa Merck Sharp & Dohme, moderada por el Dr. Honorio Bando Casado, Profesor Honorario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Presentada por nuestro Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez, y Dra. Dña. Regina Revilla Pedreira, Executive Director Policy & Comm. MSD. Actuaron como ponentes: la Dra. Esther Redondo Margüello, Jefa División Vacunación Internacional del Centro de Salud Internacional de Madrid Salud y miembro del Comité Asesor de Vacunas de la Comunidad de Madrid, con el título: "La vacunación del adulto: la gran desconocida"; y la Dra. María del Carmen Magro Horcajada, Farmacéutica Comunitaria y Coordinadora del Grupo de Inmunología de la Sociedad Española de Farmacia Familiar y Comunitaria (SEFAC), con el título: "El papel del farmacéutico comunitario. Desde la recepción a la dispensación de las vacunas en el adulto".

Sobre "RECIENTES AVANCES EN LA HEPATOTOXICIDAD DE FÁRMACOS". Introducida por Dña. María Cascales Angosto, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Actuaron como ponentes, la Dra. María José Gómez-Lechón Moliner, Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, con el título: "Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclínico del metabolismo y hepatotoxicidad de fármacos"; la Dra. María Teresa Donato Martín, Investigadora de la Unidad de Hepatología Experimental del Hospital Universitario La Fe, y Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia, que disertó con el título: "Hepatotoxicidad idiosincrásica por fármacos: promesas y limitaciones de las estrategias in vitro"; y el Dr. Ramiro Jover Atienza, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia, con el título: "Esteatosis y colestasis inducida por medicamentos: mecanismos y biomarcadores".



Sobre "ANTIMICROBIAL STEWARSHIP. IMPORTANCIA DEL USO ADECUADO DE LOS ANTI-MICROBIANOS EN EL SISTEMA SANITARIO", en colaboración con el Laboratorio MSD. Inauguró y presentaron el acto D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y del Instituto de España, y la Dra. Regina Revilla, Directora Ejecutiva Política y comunicación. MSD España; y el Dr. Honorio Bando Casado, Profesor Honorario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia. La presentación del "Programa AMS-PROA Excelencia", corrió a cargo de Dña. Pilar Muñoz, Directora de Formación y Proyectos, de la Fundación UNED; el Primer Debate sobre: "Problemática resistencias antimicrobianas en el entorno hospitalario", fue moderado por Dña. Natividad Calvente, Directora Asociada Relaciones Institucionales-MSD España y participaron los Dres. José Miguel Cisneros, Presidente SEIMC y Miguel Ángel Calleja, Presidente SEFH. El Segundo debate: "Problemática resistencias antimicrobianas en atención primaria" fue moderado por Dña. Carolina Arroyo, Key Account Management, Scientific Societies MSD España y en el participaron los Dres. José María Molero García, Miembro GdT Enfermedades Infecciosas, semFYC, y Dña. Ana Molinero Crespo, Vicepresidenta SEFAC.

PACTO POR LA SANIDAD

La Asociación Española de Derecho Farmacéutico (ASEDEF) inició un ciclo de reuniones con la intención de elaborar un "Pacto por la Sanidad" en nuestro país. La RANF ha albergado durante el curso 2017 los tres primeros actos que la ASEDEF organiza para poner en marcha en nuestra sede (RANF) el ciclo NUESTRA CONTRIBUCIÓN AL PACTO DE ESTADO POR LA SANIDAD, que tendrá lugar en nueve sesiones con presencia de instituciones y agentes del sector: Administraciones del Estado y Comunidades Autónomas, Senado, Profesionales, Pacientes, Empresas e Industrias sanitarias, Medios de comunicación, etc. actos todos ellos en nuestra sede RANF.

El I Encuentro fue presentado con la Presidencia de D. Mariano Esteban, Presidente de la RANF, por D. Mariano Avilés, Presidente de ASEDEF y estuvo moderado por D. Mario Mingo Zapatero. Contó con la participación de D. Antonio Alarcó, Portavoz del grupo parlamentario popular en la Comisión de Sanidad del Senado; D. José Martínez, portavoz del grupo parlamentario socialista en la misma comisión; D. Jon Darpón Sierra, Consejero de Salud del Gobierno Vasco.

El II Encuentro: "PERSPECTIVA DESDE LA CONSEJERÍA DE SALUD DEL PAÍS VASCO" contó con las palabras de bienvenida del Presidente de la RANF D. Mariano Esteban y participaron: el Presidente de ASEDEF, D. Mariano Avilés; la Directora General Cartera Básica de Servicios del SNS y Farmacia, D. Mario Mingo, que actuó como coordinador de la sesión y el Consejero de Salud del País Vasco, D. Jon Darpón.

El III Encuentro: "PERSPECTIVA DESDE UNA CONSEJERÍA DE HACIENDA EL FUTURO ES LA INNOVACIÓN NUESTRA CONTRIBUCIÓN AL PACTO DE ESTADO", contó con la intervención de la Consejera de Economía, Empleo y Hacienda de la Comunidad de Madrid, Doña Engracia Hidalgo Tena, en el contexto actual de crisis económica, donde nos dio su visión sobre el debate entre sostenibilidad, innovación y

financiación de los sistemas sanitarios para garantizar el derecho a la protección de la salud, la universalidad y la equidad.

REUNIÓN DE ACADEMIAS EXPERIMENTALES.

Tuvo lugar la SESIÓN CIENTÍFICA EXTRAORDINARIA CONJUNTA DE LA REAL ACADEMIA DE INGENIERÍA, REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA,

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES Y REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. Se debatió el tema sobre "NANOTECNOLOGÍAS". Este año se celebró en la sede de la Real Academia de Ingeniería. Abrió el acto el Presidente de la RAI, D. Elías Fereres Castiel, y la presentación corrió a cargo de Dña. María Vallet Regí, Académica de Número de las Reales Academias de Ingeniería y Nacional de Farmacia. Intervinieron como ponentes, Dña. María Vallet Regí, con el tema "Nanosistemas inteligentes para liberación de fármacos"; le siguió D. Antonio Hernando Grande, Académico de Número Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, con el título: "Magnetismo en la nanoescala"; a continuación disertó D. Juan Tamargo Menéndez,

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y de la de Medicina, con el título: "Nanotecnología en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares"; y finalmente actuó Dña. María José Alonso Fernández, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, con el tema: "Aplicación de la Nanotecnología farmacéutica al desarrollo de nuevos medicamentos".

REUNIÓN DE DIPUTADOS Y SENADORES CON LAS REALES ACADEMIAS DE MEDICINA Y DE FARMACIA.

Los Académicos de las Reales Academias Nacionales de Medicina y de Farmacia se reunieron en la Cámara Baja con parlamentarios de Sanidad para exponerles diferentes iniciativas, propuestas y reivindicaciones en materia de salud, e intentar dar respuesta a sus principales preocupaciones sobre el tema.

La RANF ha mostrado a los políticos su postura ante temas candentes como la homeopatía, "sin razón de ser en la terapéutica actual", o las vacunas, de las que abogaron por una mayor información a la población, homogeneización de los calendarios vacunales y mayor inversión en prevención e investigación. Igualmente, han sugerido diversas propuestas como la educación de la población en temas sanitarios o la imposibilidad de la Academia por mantener los objetivos marcados tras los recortes.



CÁTEDRAS

Este año tuvieron lugar las dos Cátedras que se vienen celebrando. La 1ª SESIÓN DE LA "CÁTEDRA PEDRO GUILLÉN DE MEDICINA REGENERATIVA", contando con dos científicos punteros en el panorama mundial en esta disciplina. Bajo la Presidencia y Presentación de D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y del Instituto de España, se dio paso a las ponencias de los Dres. D. Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Académico de Honor de la RANF y Jefe de Investigación Gene Expression Laboratory. Salk Institute. La Jolla California (USA) que disertó sobre "Regeneración tisular, enfermedad y envejecimiento"; el Dr. Manuel Serrano Marugán, Profesor ICREA. Instituto de Investigación Biomédica (IRB Barcelona), con el título: "Senescencia celular y reprogramación en respuesta al daño tisular". Cerro de la

Sesión D. Pedro Guillén García, Académico de Honor de la RANF, Fundador y Director de la Clínica CEMTRO de Madrid y Decano Honorario de la Universidad Católica de Murcia (UCAM).

Celebramos la 3ª SESIÓN DE LA “CÁTEDRA JUAN ABELLÓ de Medicina del Dolor”, con el título "LOS CANALES TRP EN LA SEÑALIZACIÓN SENSORIAL Y DOLOROSA, FARMACOLOGÍA ACTUAL". La sesión fue presentada por D. Mariano Esteban; y D. Juan Abelló. La organización y presentación de la Sesión corrió a cargo de Dña. Mª Teresa Miras Portugal. Actuaron como ponentes: el Prof. Antonio Ferrer Montiel, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad Miguel Hernández, que disertó sobre "Canales TRP: Sensores Nociceptivos". El Prof. Carlos Belmonte, Catedrático Emérito de Fisiología General y Especial en la misma Universidad de Alicante, disertó sobre "Canales TRP, nuevos actores en la detección del dolor y la sequedad de las mucosas" y el Prof. Juan Tamargo, Catedrático de Farmacología en la Universidad Complutense de Madrid y Académico de Número de la RANF, sobre el tema: "Farmacología actual de los TRP". Clausuró el acto el fundador y titular de la Cátedra D. Juan Abelló Gallo.

PRESENTACIONES DE LIBROS

El libro con el título: "MORIR JOVEN, A LOS 140 AÑOS". Se fundamenta en el significado de los telómeros en el envejecimiento y la historia de como trabajan los científicos para conseguir que vivamos más. Presidió el acto D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF. La introducción sobre los capítulos del libro corrió a cargo de D. Bartolomé Ribas Ozonas, Académico Secretario de la RANF. La presentación fue realizada por Dña. María Blasco Marhuenda, Académica Correspondiente de la RANF, y por Dña. Mónica G. Salomone, periodista especializada en divulgación científica.

Presentación de un segundo libro, con el título: "MEDITERRANEAN WILD EDIBLE PLANTS. ETHNOBOTANY AND FOOD COMPOSITION TABLES". Presidió el acto D. Bartolomé Ribas Ozonas, Académico Secretario de la RANF. La introducción del libro corrió a cargo de Dña. Esperanza Torija Isasa, Académica Correspondiente de la RANF. Los ponentes fueron los editores del libro: Prof. Dra. María de Cortes Sánchez Mata, Prof. Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia de la UCM: "Conociendo las plantas silvestres comestibles: una alternativa saludable para nuestra alimentación"; y Dr. Javier Tardío Pato, Instituto madrileño de investigación y desarrollo rural, agrario y alimentario, IMIDRA: "Plantas silvestres comestibles de uso tradicional"

Y el tercer libro con el título: "LAS MEDICINAS DE LA HISTORIA ESPAÑOLA EN AMÉRICA" ("MEDICINES OF SPANISH HISTORY FROM AMERICA"). En colaboración con la Fundación Lilly y la Universidad de Santiago de Compostela). Fue presidido por D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y del Instituto de España. Como ponentes actuaron la Dra. Dña. Pilar Goya Laza, Presidenta de la Sociedad Española de Química Terapéutica, el Dr. Francisco Zaragoza, Catedrático de Farmacología de la Universidad de Alcalá, y su autor D. Enrique Raviña Rubira, Académico Correspondiente de la RANF, que como autor del libro se explayó agradeciendo a todos su apoyo y estímulo en la elaboración del mismo. Cerró el acto D. Mariano Esteban Rodríguez, que presidía el acto.

CURSOS Y SESIONES CIENTÍFICAS CON PROYECCIÓN UNIVERSITARIA

Es de destacar la gran repercusión de nuestras actividades científicas en nuestra sociedad y a nivel internacional, por las conferencias y cursos retransmitidos por ranf-TV y colgados en nuestra red.

Este año se ha celebrado el "IV CURSO AVANZADO SOBRE OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO". Bajo la dirección del Académico de Número D. Francisco J. Sánchez Muniz, y que contó con la Coordinación de los Académicos de Número Dres. Bartolomé Ribas Ozonas y Antonio L Doadrio Villarejo, y los Académicos correspondientes Dres. Ascensión Marcos Sánchez y J. Alfredo Martínez Hernández.

El curso ofreció créditos ECTS concedidos por la Universidad Complutense y la Universidad de Alcalá.

También se celebró el "CURSO AVANZADO SOBRE INMUNONUTRICIÓN", dirigido por el Académico de Número D. Francisco J. Sánchez Muniz y la Académica Correspondiente, Dña. Ascensión Marcos Sánchez. Asimismo, contó con un crédito ECTS, concedido por la UCM y la Universidad de Alcalá.

En el mes de noviembre se celebró el curso en su segunda edición sobre: "MECANISMOS FISIOLÓGICOS Y CELULARES DE LA CONTRACEPCIÓN", realizado en colaboración con el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, por alternancia en su sede. Estuvo dirigido y editado por el Académico de Número D. Bartolomé Ribas Ozonas y coordinado por D. José Antonio Clavero Núñez.

REUNIONES ACADÉMICAS INTERNAS

La Actividad Académica se complementó con las reuniones de las Secciones y Comisiones. Las Secciones se reunieron en 18 ocasiones y las Comisiones en 6. Además la Junta de Gobierno tuvo 9 Sesiones, y la Junta General se reunió en 3 ocasiones de forma Ordinaria y 5 en Sesión Extraordinaria.

Juntas Generales: Durante el año 2017, se celebraron elecciones en los cargos de Secretario, para el que fue elegido el Académico D. Jesús J. Pintor Just; y para el cargo de Tesorero fue elegido el Académico D. Antonio Luis Doadrio Villarejo.

En la Junta General Extraordinaria de junio fue elegido Vicepresidente, el Académico D. Benito del Castillo García.

En Junta General Extraordinaria de diciembre, fue elegido Académico de Número en la Medalla 15, D. José Carlos Menéndez Ramos, Catedrático de Química Orgánica y Farmacéutica en la Facultad de Farmacia de la UCM

PREMIOS Y DISTINCIONES RECIBIDAS POR LOS EXCMOS. SRES. ACADÉMICOS

En cuanto a los honores recibidos por nuestros Académicos ay que destacar:

Nuestro Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez, fue nombrado nuevo Presidente del Instituto de España.

Dña. M^a Teresa Miras Portugal, ha sido financiada por la Fundación Ramón Areces con una ayuda a la investigación en “Ciencias de la Vida y de la Materia”, con un Proyecto que permitirá conocer el efecto de diversos compuestos y mutaciones genéticas en el desarrollo del córtex cerebral en sus fases tempranas.

La Académica Dña. María Vallet Regí, ha sido galardonada, con el 'Premio Julio Peláez dedicado a “Pioneras de las Ciencias Físicas, Químicas y Matemáticas”, de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. Y elegida Académica de Medicina de la de EE.UU.

El Académico D. Juan Tamargo Menéndez recibió un emotivo y multitudinario homenaje, con motivo de su jubilación. Y le fue concedida la medalla de Oro de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Y la medalla de Oro de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá.

La Académica Dña. M^a José Alonso Fernández, ingresó en la Academia de Medicina de Estados Unidos. Fue nombrada Presidenta electa de la “Controlled Release Society”, en el ámbito de los sistemas de liberación de fármacos. Y recibió el “Premio de la Ciencia” otorgado por la Asociación de Empresarios Gallegos en Cataluña.

El Académico Vicepresidente D. Benito del Castillo García, fue nombrado Doctor "honoris causa" por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima, (Perú).

Invitado como conferenciante para la apertura del Congreso de Ciencias Farmacéuticas de COIFFA, en sus bodas de plata, en Riobamba (Ecuador).

El Académico D. Francisco José Sánchez Muniz, fue invitado por la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo de México donde impartió un Curso sobre “Síndrome Metabólico y Obesidad” que tuvo lugar en Pachuca (Hidalgo, México). Compartió experiencias de Investigación en el Área de Salud con Profesores y alumnado de Pregrado y Postgrado de aquella Universidad. Recibió sendos diplomas y el reconocimiento por el Director del “Instituto de Ciencias de la Salud” de aquella ciudad.

El Académico D. Bartolomé Ribas Ozonas, durante el VII Encuentro de Academias de Farmacia Iberoamericanas, celebrado en septiembre en Asunción, Paraguay, recibió 2 medallas conmemorativas del 80 Aniversario de la fundación de la Asociación de Ciencias Farmacéuticas de Brasil; y del 50 Aniversario de la fundación de la Academia Nacional de Farmacia de Brasil, otorgadas a nuestra Real Academia, y que hizo entrega a nuestro Presidente y del Instituto de España D. Mariano Esteban Rodríguez. Asimismo fue nombrado Cofundador del “Universal Institute for Justice and Peace” durante el “8º Congreso Internacional de la “International Academy of Science Ararat” que tuvo lugar en el Palacio de las Naciones Unidas de Ginebra, Suiza.

DISTINCIONES A LOS ILMOS. SRES. ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES.

El Prof. Dr. D. Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata ha obtenido una beca de investigación a través del Real Colegio Complutense (RCC-Harvard) adscrito a la prestigiosa Universidad de Harvard (MA, USA), en el Departamento Organismic and Evolutionary Biology (OEB) desde donde investigó en las incommensurables colecciones botánicas que se conservan en los diferentes herbarios institucionales de Harvard (HUH); sus estudios están relacionados con los importantes materiales originales de edafismos que se recolectaron durante las diferentes expediciones del siglo XIX al Pacífico Noroeste. Asimismo, se le ha concedido la Medalla de Honor de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense por su dedicación ininterrumpida a la docencia, investigación y formación vocacional de nuevos profesionales de la Farmacia durante los últimos 35 años, que fue impuesta por la Ilma. Sra. Decana, Profa. Dra. Irene Iglesias

El Prof. D. Antonio M. Rabasco Álvarez ha sido elegido Secretario de la Academia Iberoamericana de Farmacia.

El Prof. D. Juan Jesús Gestal Otero he sido nombrado Profesor Emérito y se le ha concedido la insignia de oro de la Universidad de Santiago de Compostela.

El Prof. D. Francisco González de Posada, ha sido nombrado Socio de Honor de la Sociedad Erasmiana de Málaga.

La Prof. Dña. M^a Soledad Campos Díez recibió el título de Profesora Honorífica del Claustro de la Universidad de Valahia (Rumania).

La Prof. Dña. Margarita del Val ha sido elegida como Vocal en la Junta de Gobierno de la Confederación Española de Sociedades Científicas de España, COSCE. 2017-2021, en representación de 38 Sociedades Científicas del Área de las Ciencias de la Vida y de la Salud.

El Prof. D. Ernesto Castañeda ha sido nombrado "Colegiado Distinguido "del Ilustre Colegio Oficial de Químicos de Madrid”.

PUBLICACIONES

Se han editado “on line” los cuatro números de la revista “Anales” correspondientes al año 2017. Así como el número extraordinario de la Monografía de Aguas Minerales y Mineromedicinales.

Y como todos los años, se ha publicado en papel, el Discurso de la Sesión Inaugural “Las células gliales” (de María Teresa Miras) y el “Anuario” nº 69.

El Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo ha publicado la monografía XLV de la RANF, titulada “Iniciación y desarrollo de la Bioquímica universitaria española (1886-1963).

Todas estas mencionadas obras, han sido coordinadas por nuestro Académico Excmo. Sr. Antonio Luis Doadrio Villarejo, y se publicaron en formato de libro electrónico o “e-book” en edición “on line” y digital DVD para PC Windows y Mac.

BIBLIOTECA, ARCHIVO Y MUSEO

Bajo la dirección de la Excmo. Sra. Dña. Rosa Basante Pol.

Siguiendo con el proceso de digitalización del fondo antiguo o histórico, este año se ha conseguido una nueva subvención del Ministerio de Cultura con la que podremos continuar el proyecto de difusión de los libros del siglo XIX. En la actualidad contamos en el catálogo con 3154 obras digitalizadas y un total de 325.120 imágenes. Se pueden consultar en el Catálogo virtual ([Biblioteca virtual de la Real Academia Nacional de Farmacia](#)), existiendo la posibilidad de la búsqueda a texto completo después del proceso de OCR a que han sido sometidas. También han sido integradas en los repositorios digitales colectivos [Hispana](#) y [Europeana](#).

Se ha producido la colaboración con el grupo Bibliopugia de la Universidad Complutense de Madrid en el proyecto de la Universidad Complutense “Catálogo Colectivo de Encuadernaciones Artísticas”, que dará a conocer las mejores encuadernaciones que posee nuestra biblioteca.

Como es costumbre del más alto servicio y dedicación a todos los académicos y bien de la ciencia, investigación y de la cultura de nuestro país, se ha atendido a quienes han solicitado nuestro servicio y nuestra ayuda desde la Biblioteca. Se han prestado revistas y libros, a través de los distintos medios, incluyendo digitalizaciones. Ha habido varios investigadores debidamente identificados que han sido autorizados para la consulta de documentos de nuestro archivo histórico.

Agradecemos las donaciones recibidas por parte de los siguientes Académicos: D. Manuel Ortega Mata, D. Benito del Castillo, D. Bartolomé Ribas, D. Miguel Fernández Braña, D. Federico López Mateos.

El Museo de la Farmacia y la Sala Utagawa han sido muy visitados por grupos de instituciones, como en años anteriores, acompañados principalmente por el Jefe de Negociado, Don Manuel Tirado y en ocasiones por este Académico Secretario.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro profundo agradecimiento al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por las diversas ayudas recibidas. Por la ayuda especial para restauración de las fachadas exterior e interna del patio. Así como que, gracias a la subvención presupuestaria recibida en el Curso 2017, hemos podido realizar las actividades científicas programadas, el mantenimiento de la página web, y el mantenimiento de nuestro personal. Y la nueva subvención 2017 para proseguir en adelante con la digitalización de la Biblioteca.

Agradecer a nuestro querido compañero, D. Juan Abelló Gallo, su inestimable ayuda y colaboración, la “Cátedra Juan Abelló”; así como para el concurso de premios, a todos sus patrocinadores; a D. Pedro Guillén García por la “Cátedra Pedro Guillén” para investigación y difusión de la medicina regenerativa, a CINFA en la persona de D. Luis Ordiéres, al Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, y al Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y al Premio Antonio Doadrio López. Todos ellos posibilitan premiar la labor científica principalmente de jóvenes investigadores. Asimismo la Academia y sus Académicos, agradecen a los Patronos, miembros y socios de la “Fundación José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, su importante contribución y dedicación a las actividades académicas de difusión de la ciencia y formación de la juventud y de la sociedad española; y a gran número de Colegios de Farmacéuticos de España que en atención a la brevedad de esta exposición no podemos enumerar. Para todos ellos el agradecimiento de esta Real institución académica.

Termino dando las gracias a todos los Académicos de Número y Correspondientes por la colaboración prestada, tanto a aquellos que han participado día a día en las actividades realizadas en esta sede académica, a los que han organizado e intervenido con interesantes conferencias y temas de actualidad, como a los que han permitido con su asistencia y contribución, colocar esta Real Academia en lo más alto del nivel científico y de mayor prestigio entre las instituciones españolas. Y al personal contratado, que con su exquisito trato a los Académicos, dedicación y esfuerzo, mantienen día a día el funcionamiento de la misma.

Académico Secretario RANF
Dr. Bartolomé Ribas Ozonas



Información académica

Jesús J. Pintor Just

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el primer trimestre del año 2018 tuvieron lugar un total de 8 sesiones científicas y el V Curso Avanzado sobre Obesidad y Síndrome Metabólico.

Las actividades se iniciaron después de las vacaciones de Navidad, con la celebración de la Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico 2018, a las 19 horas, el día 18 de enero, donde tuvo lugar la Toma de Posesión de D. Jesús J. Pintor Just como nuevo Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia, sucediendo así en el cargo a D. Bartolomé Ribas Ozonas.

Al Acto acudieron numerosas personalidades del mundo académico y farmacéutico. En la mesa presidencial, acompañando al Presidente de la RANF, estuvo el Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, D. José Elguero Bertolini.

La Sesión Inaugural terminó, tras la lectura de la memoria de Secretaria 2017, por el Dr. Ribas Ozonas y el Discurso reglamentario a cargo del Dr. Doadrio Villarejo, con la entrega de placas conmemorativas, diplomas a los Socios Colaboradores Farmacéuticos y los Premio del Concurso Científico 2017.

El 25 de enero se celebró, en colaboración de la Fundación José Casares Gil, la Mesa Redonda titulada: "Difusión de la nutrición artificial en España: Sociedades médicas y revistas científicas" que consistió en un Homenaje al Dr. Jesús M. Culebras Fernández. La presentación y coordinación del acto corrió a cargo del Académico de Número, Excmo. Sr. D. Francisco J. Sánchez Muniz y actuaron como ponentes los Dres.: D. Jesús M. Culebras Fernández, Director de la Revista "The Journal of Negative & No Postives Results" y Director Emérito de la Revista "Nutrición Hospitalaria", que habló sobre "La SENPE y la revista Nutrición Hospitalaria: Orígenes y desarrollo"; Dña. Teresa Bermejo Vicedo, Jefa del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Ramón y Cajal y Directora de la Revista "Farmacia Hospitalaria" disertó sobre "La revista Farmacia Hospitalaria afín a los intereses de la Nutrición Artificial"; D. José Manuel Moreno Villares, de la Unidad de Nutrición Clínica del Hospital 12 de Octubre y Director de la Revista "Nutrición Hospitalaria" nos informó sobre "El futuro de Nutrición Hospitalaria"; por último intervino el Excmo. Sr. D. Jesús J. Pintor Just, Académico Secretario de la RANF y Editor Ejecutivo de la Revista "Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia", en cuya intervención habló sobre "La revista Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia y la Nutrición".

Durante el mes de febrero se celebraron cuatro conferencias, todas ellas realizadas bajo el patrocinio de la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF.

El 1 de febrero tuvo lugar la conferencia titulada "Los circuitos de señalización en levadura se pueden reconfigurar: Actualidad de un organismo modelo para la biología y la patología celular", a cargo del Excmo. Sr. D. César Nombela Cano, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y Catedrático de Microbiología en la Facultad de Farmacia de la UCM; y del Prof. Dr. Humberto Martín Brieva.

Humberto Martín Brieva es Profesor Titular de Microbiología en Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y acreditado para Catedrático. Docente y coordinador de diversas asignaturas en los grados de Farmacia, Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Odontología y en el Master de Microbiología y Parasitología, ha impartido enseñanza especializada en escuelas de verano de la Comunidad de Madrid y de la Universidad Complutense, así como conferencias en otras universidades o en másteres privados. Ha participado en más de 20 proyectos de investigación. En este ámbito su tarea se ha centrado fundamentalmente en el estudio de la señalización celular, en particular en las rutas mediadas por MAP quinasas, utilizando principalmente las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* como organismos modelo. Ha disfrutado de periodos de investigación en los laboratorios de los Doctores Paul Russell (Scripps Clinic, USA), Jonathan Millar (National Institute for Medical Research, Londres) y Nevan Krogan y Wendell Lim (Universidad de San Francisco, California, USA). Esta labor queda recogida en más de 30 artículos científicos publicados en prestigiosas revistas internacionales del área de la Microbiología, Bioquímica y Genética, varios capítulos de libros, una

patente y más de 70 comunicaciones a congresos nacionales e internacionales. Ha desempeñado el cargo de Secretario de la Sociedad Española de Microbiología y desde 2013 es el Presidente del Grupo Especializado de Hongos Filamentosos y Levaduras de la Sociedad Española de Microbiología.

En su ponencia, los Dres. Nombela Cano y Martín Brieva nos informaron que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene un lugar destacado como sistema experimental en la Historia de la Ciencia, desde el descubrimiento de las enzimas a la Biología Sintética y la Biología de Sistemas. Durante años los esfuerzos de investigación de su grupo se han dirigido al estudio de circuitos de señalización transmembranal controlados por un grupo de enzimas fosforilantes de proteínas en serina o treonina. Las referidas enzimas, denominadas “quinasas de proteínas activadas por mitógenos” (MAPK), están el eje central de circuitos de señalización que recoge estímulos externos a la célula y activan respuestas a nivel genético, controlando la expresión de genes específicos. La identificación en su laboratorio en los años 90 de la MAPK Slt2 condujo a la identificación de la cascada de señalización de “integridad celular” (IC) una de rutas no esenciales de la célula de levadura, que le permite reaccionar a diversos tipos de estrés. La ruta IC resulta reprogramable mediante modificación genética de los elementos que la integran. Además existen circuitos ortólogos de la ruta IC en células de mamíferos, algunas de cuyas alteraciones se asocian a cáncer y trastornos neurodegenerativos en humanos. Un buen número de las funciones propias del genoma humano se pueden expresar en levadura dando lugar a estirpes humanizadas que han utilizado como modelos para analizar funciones de genes humanos así como identificar efectores moleculares que los inhiben o activan.

El 8 de febrero se impartió se impartió la conferencia titulada “Fármacos multidiana como una nueva estrategia contra las enfermedades degenerativas” a cargo del Excmo. Sr. D. José Carlos Menéndez Ramos, Académico de Número Electo de la RANF, que fue presentado por la Académica de Número, Excmo. Sra. Dña. Carmen Avendaño López.

En su intervención, el Dr. Menéndez comentó que tanto la enfermedad de Alzheimer como otras enfermedades neurodegenerativas son de origen multifactorial, es decir, su etiología comprende una amplia serie de procesos patológicos interconectados. Como consecuencia, la enfermedad continúa su avance cuando se corrige uno solo de estos procesos de forma aislada. Existen varias aproximaciones terapéuticas que pueden, en principio, ayudar a superar estas limitaciones y la más reciente y prometedora es la estrategia multidiana. Los fármacos multidiana pueden definirse como moléculas que han sido diseñadas racionalmente para que sean capaces de modular varias dianas terapéuticas asociadas a una enfermedad. En la conferencia nos expuso los fundamentos del diseño de agentes multidiana, que aclaró mediante ejemplos tomados de la investigación que se lleva a cabo en su grupo de trabajo. Las principales dianas involucradas en este trabajo son diversas proteínas transportadoras de calcio, la ciclooxigenasa 1, los receptores nicotínicos centrales y la vía de señalización Nrf2-ARE.

El 15 de febrero se celebró la conferencia sobre “Receptores Heteroméricos: Una Aplicación al Tratamiento del Glaucoma” a cargo de la Dra. Hanan Awad Alkozi, quien fue presentada por la Académica de Número de la RANF, Excmo. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal. La sesión fue presidida por el presidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban y por su Alteza Real, el Príncipe Mansour Al Bin Khalid A. Alfarhan Al-Saud, Embajador de Arabia Saudí.

Hanan Awad Alkozi, estudió el grado de Optometría en la Universidad King Saud, en la Facultad de Ciencias Aplicadas de la Salud en Riad, Arabia Saudita. Posteriormente trabajó en los hospitales King Jaled Eye Specialist Hospital, National Guard Hospital, King Abdulaziz University Hospital y King Fahad Medical City. Mas tarde se desplazó a España para realizar sus estudios de Master en Optometría y Ciencias de la Visión en la UCM. Es Doctora en Ciencias por la Universidad Complutense y ha realizado estudios sobre el papel de la melatonina en la regulación y el control de la presión intraocular. Actualmente es “Research Fellow” en el Institut of Biomolecular and Biomedical Research del Universtiy College Dublin (Irlanda). Su investigación ha sido publicada en prestigiosas revistas internacionales de las áreas farmacología, oftalmología y bioquímica. Pertenece al Editorial Board de las prestigiosas revistas Journal EC Pharmacology, Toxicology y Journal of Bioequivalence and Bioavailability y Journal of Biomolecules and Biochemistry.

En su conferencia nos mostró que los receptores acoplados a proteínas G constituyen una familia con una gran importancia en la farmacología actual. Desde mediados de los años 90 diversos estudios han demostrado la existencia de la oligomerización de receptores GPCR, dadas sus características estructurales y su localización. La interacción proteína-proteína puede ocurrir formando homodímeros, heterodímeros o oligómeros de orden superior. Esta interacción abre un abanico de posibilidades terapéuticas, ya que la oligomerización puede cambiar las propiedades de los receptores. En su conferencia expuso los fundamentos de la heteromerización, explicando mediante ejemplos relevantes como son dichas interacciones. Desde un planteamiento más práctico, explicó como la existencia de receptores heteroméricos de melatonina y alfa adrenérgicos tienen un papel muy relevante en la patofisiología del glaucoma, y como una combinación de moléculas pueden convertirse en una terapia novedosa para el tratamiento de esta patología.

Del 19 al 22 de febrero, tuvo lugar la V Edición de su Curso avanzado sobre Obesidad y Síndrome Metabólico, bajo la Dirección del Académico de Número, el Dr. Francisco J. Sánchez Muniz. Contó con la coordinación de los Ilmos. Sres. Académicos Correspondientes, Dres. Ascensión Marcos Sánchez y J. Alfredo Martínez Hernández.

La obesidad es la enfermedad metabólica más prevalente del siglo XXI. Su relación con otras patologías como el síndrome metabólico, la diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular e incluso cáncer es hoy por hoy innegable. El conocimiento, prevención y tratamiento de la obesidad constituyen, por tanto temas prioritarios

de Salud y mecanismos por los que reducir sus comorbilidades. El IV Curso Avanzado sobre Obesidad supone una puesta al día, en la que se estudian y tratan muchos aspectos centrales de dicha patología y de sus comorbilidades asociadas. Este IV Curso pretende además en el marco de la Real Academia Nacional de Farmacia el acercamiento de alumnos, profesionales, investigadores y docentes seniors y nóveles interesados en el tema de obesidad con acercamiento a los factores nutricionales, genéticos, de estilo de vida, metabólicos, hormonales, etc.

Como años anteriores, el curso contó con 2 Créditos ECTS concedidos por las Universidad Complutense y de Alcalá de Henares y tuvo un elevado número de inscripciones, con la asistencia de 110 alumnos de distintas Universidades.

El 22 de febrero, se celebró la conferencia titulada: “Riesgo Cardiovascular en Obesidad y Síndrome Metabólico” a cargo de la Ilma. Sra. Dña. Lina Badimón Maestro, Académica Correspondiente de la RANF, que supuso el cierre del V Curso avanzado sobre Obesidad y Síndrome Metabólico. Fue presentada por el Académico de Número y Director del Curso, Excmo. Sr. D. Francisco J. Sánchez Muniz.

El 1 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF, tuvieron el honor de celebrar la I Mesa Redonda sobre el BALNEARIO DE ARCHENA (Murcia), en la que intervinieron como ponentes varios Doctores pertenecientes a la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales.

El Dr. D. Francisco Torella Mateu nos expuso su “Estudio microbiológico de las aguas del Balneario”.

La Excmo. Sra. Dña. M^a del Carmen Francés Causapé, el Dr. José López Guzmán, la Dra. María López González y el Dr. Gonzalo Matilla hablaron sobre la “Historia y Generalidades”, donde nos informaron que el Balneario de Archena está a dos kilómetros de la villa de Archena, en el interior de la Región de Murcia, Comunidad Autónoma de Valencia. Es uno de los Balnearios con más historia de la Península Ibérica y está situado en la Comarca histórica natural Valle del Ricote y en la cuenca media del río Segura. Los romanos ya utilizaron sus aguas con fines medicinales y son abundantes los yacimientos arqueológicos de iberos y romanos en las propias tierras del balneario por lo que ha sido declarado Zona Arqueológica por Decreto 5/2006, de 3 de febrero, del Consejo de Gobierno de la Región de Murcia. El Balneario de Archena obtuvo en 31 de marzo de 1869 la declaración de utilidad pública para la explotación de sus aguas mineromedicinales de las que ya hace mención Alfonso Limón Montero en el siglo XVII. Entre las personalidades Archeneras destaca Pedro Guillén García, miembro de honor de nuestra Real Academia. Se da cuenta de los médicos que fueron Directores del establecimiento balneario desde 1815 a nuestros días en que la dirección la ostenta el Doctor Luis Ovejero Ovejero quien además tiene la responsabilidad de la Cátedra de Hidroterapia e Hidrología Médica. Sus instalaciones balneoterápicas están adecuadas para que el bañista reciba tratamientos terapéuticos especializados, consta de tres hoteles: termas y Levante de cuatro estrellas y León de tres estrellas, además de un gran espacio ajardinado. Este Balneario es el único de España que goza del Sello de Calidad Europa.

La Dra. María Roser Botey Fullat nos informó de su “Estudio de la Climatología del Balneario”, donde concluyó que se trata de un clima seco, tipo estepa cálida, con una precipitación acumulada media anual en torno a 282 mm con un máximo en el mes de octubre, y una temperatura media anual próxima a 18,2 °C. Los inviernos son suaves (temperatura media del invierno de 11,2 °C) aunque también se pueden producir algunas heladas y los veranos calurosos (temperatura media del verano 26,7 °C), siendo relativamente frecuentes las noches con temperaturas mínimas superiores a 20°C en los meses de julio y agosto. La sensación térmica es de bienestar en los meses de primavera y de octubre a noviembre, mientras que es de calor en verano y de frío tan sólo los meses de diciembre y enero.

Y, por último, los Doctores Daniel P. de la Cruz Sánchez Mata y Miguel Ladero Álvarez expusieron su “Estudio sobre la Vegetación del Entorno de las Aguas del Balneario”. El balneario de Archena se ubica en un enclave privilegiado, en pleno Valle de Ricote, a muy baja altitud, en la misma orilla del río Segura; éste fluye hacia la ciudad de Murcia para acabar desembocando en el Mediterráneo en tierras alicantinas de Guardamar del Segura. La utilización de las aguas termales en su entorno se conoce desde tiempos romanos como lo atestiguan las interesantes ruinas y vestigios que se conservan en el propio balneario. Esta ubicación geográfica, geología y bioclimatología condicionan la vegetación natural del territorio. La caracterización bioclimática responde a un bioclima Mediterráneo xérico-oceánico, con termotipo termomediterráneo superior y ombroclima semiárido inferior; los sustratos margosos y margoso-calcáreos permiten el desarrollo de vegetación climatófila de carácter arbustivo (espinares con palmitos y aladiernos) con etapas seriales muy extendidas (atochares, romerales, salviares y tomillares); en áreas mal drenadas o arceicas prosperan albardinarios permanentes de interés desarrollados sobre hábitats subsalinos mientras que la vegetación climácica edafohigrófila se corresponde a choperas albares con adelfas; la vegetación serial, nitrófila y los extensos cultivos hortícolas, de frutales y de cítricos denotan la intensa antropización del paisaje del entorno del balneario desde tiempos históricos.

El 8 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil celebraron la conferencia sobre “Nuevas perspectivas en la terapéutica cardiovascular” a cargo del Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez, Académico de Número de la RANF.

El 15 de marzo se celebró la Mesa Redonda, patrocinada por la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF, cuyo tema a tratar fue “Relevancia clínica de las interacciones de los alimentos en la farmacoterapia”. La Sesión fue presentada y coordinada por el Excmo. Sr. D. Francisco J. Sánchez Muniz, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y contó con las ponencias de los Dres. D. Mariano Madurga Sanz, Ex-Jefe del Área de Coordinación

del Sistema Español de Farmacovigilancia (SEFV-H), de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y experto de la OPS (Organización Panamericana de la Salud), que disertó sobre “Interacciones adversas de alimentos y medicamentos. Impacto, conocimiento y actualización”; y D. Manuel Martínez Sesmero, Director de Investigación e Innovación de la SEFH y Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, que expuso sobre “Interacciones fármaco-nutriente en el soporte nutricional artificial”.

El 22 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la Mesa Redonda sobre: “Modificación genética humana: una prespectiva tecnológica y ética”. El acto consistió en una sesión conjunta organizada por las Secciones 2ª “Biología, Biotecnología y Farmacogenómica y 6ª “Historia, Legislación y Bioética” y contó como ponentes con los Académicos de Número de la RANF, Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón, que habló sobre el “Impacto de las nuevas tecnologías en el Homo sapiens”; y el Excmo. Sr. D. César Nombela Cano, que trató el tema de la “Experimentación con embriones humanos: ¿Tecnología biomédica o recuperación de la eugenesia?”.

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos, hay que destacar:

La Excmo. Sra. Dña. Mª Teresa Miras Portugal, Académica de Número de la RANF, ingresó el pasado 14 de marzo como Académica Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia. En el transcurso del acto protocolario pronunció el discurso de ingreso titulado “Señalización por nucleótidos: neurogénesis, neuroprotección y reparación del sistema nervioso”. El discurso de presentación corrió a cargo de la Académica de Número la Excmo. Sra. Dña. María José Alonso Fernández.

El Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza recibió el Premio Excelencia Académica en el Ateneo de Madrid.

Los Premios Excelencia Educativa homenajan la trayectoria y labor de una de las personalidades más destacadas de la cultura en los últimos tiempos. D. Federico Mayor Zaragoza, Presidente de la Fundación por la Paz y anterior Director General de UNESCO y Ministro de Educación y Ciencias, se convierte además en Miembro de Honor de la prestigiosa Fundación Mundo Ciudad, entidad organizadora del certamen.

La Real Academia de Farmacia ha albergado y participado en sesiones y actos extraordinarios relevantes para el mundo de la ciencia y la investigación.

El pasado 20 de marzo, el Excmo. Sr. D. Antonio L. Doadrio Villarejo obtuvo la Plaza de Catedrático del Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas en la Universidad Complutense de Madrid.

En este trimestre han tenido lugar tres de las sesiones sobre el pacto de Estado por la Sanidad, celebradas conjuntamente por la Real Academia Nacional de Farmacia y la Asociación Española de Derecho Farmacéutico (ASEDEF), tratando los temas “Perspectiva desde la Industria Farmacéutica”, “Perspectiva de los profesionales de la Farmacia” y “Perspectiva de los pacientes - El futuro es la innovación”.

Todas ellas presididas por el Presidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban y del Presidente de ASEDEF, D. Mariano Avilés, que contaron con las intervenciones de importantes personalidades como D. Antonio Bernal, Presidente de la Alianza General de Pacientes, D. Juan Carrión Tudela, Presidente de la Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER) y de su Fundación, D. Andoni Lorenzo Garmendia, Presidente del Foro Español de Pacientes (FEP) o el Consejero de Sanidad de la CAM, D. Manuel Molina Muñoz.

El 14 de febrero la Real Academia Nacional de Farmacia, representada por su Presidente, D. Mariano Esteban Rodríguez y por su Secretario General, D. Jesús Pintor Just, y la Fundación Tejerina representada por su Presidente, D. Armando Tejerina rubricaron un acuerdo en forma de Convenio Marco de colaboración.

Ambas corporaciones estrechan lazos para conseguir así, un mayor empuje en la difusión y divulgación de la Ciencia, en forma de publicaciones y/o celebración de congresos, jornadas científicas, etc, pudiendo así llegar al mayor número de científicos e impulsar la promoción de nuestros investigadores punteros tanto nacional como internacionalmente.

El Centro de Patología de la Mama fundado hace casi cuarenta años, es una entidad que desde su fundación se ha distinguido por perseguir la máxima calidad diagnóstica en la detección precoz del cáncer de mama y por su decidida apuesta a la hora de incorporar los últimos avances tecnológicos y los tratamientos oncológicos más avanzados. Su empeño en contar siempre con los últimos avances médicos, así como con los mejores profesionales, unido a un espíritu de superación constante en el aspecto científico, les permite poder ofrecer un tratamiento individualizado a cada uno de sus pacientes.

La Fundación Tejerina creada en 1998, es una entidad sin ánimo de lucro que se ha convertido en un foro de discusión, debate y promoción de proyectos de investigación y docencia relacionados con las ciencias de la salud. Su objetivo es el de la promoción, divulgación y fomento de la investigación en relación con el cáncer en general y el cáncer de mama en particular.

El 5 de marzo los Excmos. Sres. D. Mariano Esteban Rodríguez y D. Jesús Pintor Just, Presidente y Secretario General de la RANF respectivamente, acudieron en representación de esta Corporación al Acto Académico con motivo del 80 aniversario de Su Majestad Don Juan Carlos I, que bajo la presidencia de Sus Majestades los Reyes Don Juan Carlos y Dª Sofía, tuvo lugar en la sede de la Real Academia de la Historia.

El 19 de marzo en el Palacio Duque de Pastrana, el Real Forum de Alta Dirección celebró el XXXV aniversario y entrega del Máster de Oro. En este solemne acto se entregó a la Real Academia Nacional de Farmacia el Master de Oro Institucional, fue entregado por Su Alteza Real el príncipe D. Pedro de Borbón-Dos Sicilias y Orleans a nuestro Presidente, el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, quien fue acompañado por el Secretario General de la Corporación el Excmo. Sr. D. Jesús Pintor Just.

En dicho acto también se entregó el galardón tanto al Instituto de la Ingeniería de España, como los Masters Estatutarios, entre otras personalidades al Secretario de Estado para el Deporte, D. José Ramón Lete Lasa, y a Dña. María del Pino y Calvo Sotelo, Presidenta de la Fundación Rafael del Pino.

En el capítulo de Obituarios, el pasado 9 de febrero la Real Academia Nacional de Farmacia dio su último adiós a su Académico de Número, Excmo. Sr. D. Jesús Larralde Berrio.

El Dr. Larralde nació en Pamplona el 29 de noviembre de 1920. Obtuvo la Cátedra de Fisiología Animal en la Universidad de Santiago de Compostela. Allí desempeñó tareas académicas hasta 1965, cuando se incorporó a la recién nacida Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra. En ella permaneció como decano hasta su jubilación.

Tomó posesión como Académico de Número de la RANF en la Medalla 34 el 15 de octubre de 1992.

El 18 de marzo falleció el Prof. Dr. Manuel López Pérez, Presidente de la Academia de Farmacia Reino de Aragón y Académico Correspondiente de nuestra Real Institución. Fue catedrático de Bioquímica, Rector de la Universidad de Zaragoza y Presidente de la Conferencia de Rectores de España. La Real Academia siente profundamente la pérdida de tan notable científico.

Jesús J. Pintor Just

Académico Secretario RANF



Difusión de la Nutrición Clínica a través de Sociedades y Revistas Científicas. Una Mesa Redonda en la Real Academia Nacional de Farmacia

Francisco José Sánchez Muniz

Catedrático de Nutrición y de Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: frasan@ucm.es

El pasado veinticinco de enero de dos mil dieciocho tuvo lugar en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia una Mesa Redonda titulada “Difusión de la nutrición artificial en España: Sociedades médicas y revistas científicas”. En el acto se hacía además reconocimiento y homenaje al Excmo. Sr D. Jesús M. Culebras Fernández por su labor durante más de tres décadas como director de la Revista Nutrición Hospitalaria, órgano de expresión de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE).

La Mesa Redonda estuvo constituida por Excmo. Dr. Jesús Culebras Fernández Académico de Número de la Real Academia de Medicina de Asturias y León y Académico de Número de la Real Academia y Medicina de Valladolid y Fundador y Director emérito de la Revista Nutrición Hospitalaria, que habló de “La SENPE y la revista Nutrición Hospitalaria. Orígenes y Desarrollo”; por la Dra. Teresa Bermejo Vicedo, Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Ramón y Cajal y Directora de la Revista Farmacia Hospitalaria que impartió sobre “La revista Farmacia Hospitalaria, afín a los intereses de Nutrición Hospitalaria”; por el Dr. José Manuel Moreno Villares, de la Unidad de Nutrición clínica del Hospital 12 de Octubre y Director de la Revista Nutrición Hospitalaria, que disertó sobre “El futuro de Nutrición Hospitalaria” y por el Excmo. Sr. D. Jesús Pintor Just, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Óptica de la Universidad Complutense de Madrid, Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia y Editor Ejecutivo de la revista Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, que versó sobre “La revista Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia y la Nutrición”. La mesa redonda fue presentada y coordinada por el Excmo. Sr. D. Francisco José Sánchez Muniz, miembro de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y Catedrático de Nutrición y Ciencias de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid.

El profesor Sánchez Muniz se dirigió a la Mesa Presidencial y a la audiencia y tras hacer un merecido recuerdo de la labor realizada e iniciada por el Académico de número, ya fallecido, el Excmo. Sr. D. Víctor Jiménez Torres en el campo de la Nutrición Clínica y en la relación entre la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF) y la SENPE, destacó dos hechos fundamentales:

Que la Mesa redonda nacía como homenaje al Excmo. Dr. Jesús Culebras, que estuvo al mando de la Revista Nutrición Hospitalaria durante 36 años el cual hablaría de un libro (su segunda Tesis Doctoral) donde recogía muchos detalles de los inicios y establecimiento de la revista Nutrición Hospitalaria como órgano de expresión de la SENPE.

Que aquella reunión era un encuentro de revistas científicas –Nutrición Hospitalaria, Farmacia Hospitalaria, Journal of Negative and No Positive Results, y Anales de la RANF cuya finalidad es la publicación y difusión de diferentes temas científicos de actualidad y de relevancia en el campo de la salud, y en particular de la Nutrición y Nutrición Clínica con la finalidad de abrir colaboraciones e interacciones y hacerlas lo más visible posible.

Posteriormente, el coordinador, fue presentando a cada uno de los ponentes haciendo un breve esbozo de sus currícula.

El Dr. Culebras comenzó agradeciendo vivamente su presencia en la Mesa Redonda y el homenaje que la RANF realizaba a su persona. Su discurso se centró desglosando las enormes dificultades en el inicio de la Revista Nutrición Hospitalaria y los pasos que tuvo que dar para sacar a la revista de un ámbito local a otro con reconocimiento internacional premiado por el JCR con un hecho relevante, la concesión a la revista Nutrición Hospitalaria de factor de impacto, que incrementó de forma notable la visibilidad, la calidad de las publicaciones y contribuciones que recogía. Señaló que Nutrición Hospitalaria había a crecido convirtiéndose en la segunda revista más citada de las revistas en español. También destacó la enorme colaboración, difusión y contribuciones que ha tenido desde diferentes instituciones Hispanoamericanas y

comentó sobre las contribuciones de algunos países como China. Destacó el número elevadísimo de artículos publicados en los dos últimos años de su gestión. También el número elevado de Suplementos de calidad publicados por la revista, donde se recogen actividades y contribuciones de diferentes Sociedades y Congresos Científicos, así como Acuerdos Consenso de los mismos. También destacó las Publicaciones “Catedra Dr. Culebras”, donde han expuesto lecciones magistrales primerísimas personalidades en el campo de la Nutrición en España. Terminó comentando algunas anécdotas y agradeciendo al Prof. Sánchez Muniz su iniciativa.

La sesión continuó con la Dra. Teresa Bermejo Vicedo, quien después de agradecer su presencia en aquella mesa redonda y unirse a las felicitaciones al Dr. Culebras, mostró el enorme valor de lo realizado por el ponente anterior y reseñó lo que a su entender debía ser la revista Farmacia Hospitalaria: el resultado de una triada que se basa en Excelencia científica, visibilidad y gestión. Señaló que el farmacéutico hospitalario debe ser un profesional fundamental en el Hospital y en la Salud, y que hoy no se entiende un trabajo profesional sin la colaboración de equipos multidisciplinares de soporte y de asesoramiento nutricional y farmacológico. La Dra. Bermejo desglosó algunos aspectos sobre la trayectoria de Farmacia Hospitalaria y las formas de incrementar la excelencia de la revista. También habló de una serie de índices que posibilitan la inclusión de la revista dentro de la lista de aquellas con factor de impacto y su esfuerzo y gestión para conseguirlo.

El Dr. José Manuel Moreno se unió a la felicitación al Dr. Culebras, anterior director de la revista Nutrición Hospitalaria y agradeció su estancia en aquella Mesa Redonda. Esbozó la realidad actual de la investigación y de las publicaciones en revistas de impacto y cuál debía ser a su entender y el del Comité ejecutivo, el futuro de la Revista Nutrición Hospitalaria. También señaló algunos aspectos sobre la Nutrición Clínica y las novedades que esta revista internacional ha incorporado para adaptarse a los nuevos tiempos. Tras un breve análisis comparativo con otras revistas nacionales e internacionales, señaló que en las directrices había que mirar más allá del conocido factor de impacto y señaló a índice H y a otros aspectos que se aplica a las revistas para definir su excelencia. También comentó sobre la necesidad de incrementar la visibilidad no sólo de la revista, sino también de quién publica y del papel de las Redes Sociales en este campo; no obstante, también disertó sobre la dificultad de la inversión en personas y dinero que eso implicaba.

El Excmo. Sr Jesús Pintor, habló del espíritu de la Mesa Redonda y el número de contribuciones en que la RANF a través de las monografías del Instituto de España o de la Revista Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia había realizado, en particular en los 10 últimos años, el campo de la Nutrición. Señaló que era esta reunión una forma ágil donde se pretendía llegar a un compromiso entre las revistas y que debía buscarse una relación biunívoca entre ellas como vía para incrementar la visibilidad de la Nutrición y en particular de la Nutrición Artificial. No obstante, entendía que aquello era el principio y que debían fijarse aspecto que atañían a las cuatro revistas en temas como propiedad, copyrights, archivos compartidos, publicaciones comunes, etc.

Terminadas las intervenciones, El Prof. Sánchez Muniz dirigió a los ponentes la pregunta sobre qué criterios debían aplicarse y cuál era la vía más ágil para ello. Los cuatro ponentes estuvieron de acuerdo en fijar a corto plazo una serie de reuniones donde se plantearan los aspectos más importantes de colaboración y los acuerdos que beneficiaran a las revistas que participaban en la Mesa Redonda y en particular a la visibilidad de los temas relacionados con la nutrición y la nutrición hospitalaria.

Algunos asistentes felicitaron al Dr. Culebras y a la iniciativa de la reunión y a los ponentes. Cerró el acto el Presidente de la RANF, el Excmo. Dr. D. Mariano Esteban con unas palabras de felicitación al Dr. Culebra por su empuje y labor bien hecha y deseando la puesta en marcha de futuras reuniones donde se fijen los parámetros de colaboración y el compromiso de una mayor permeabilidad e interacción entre revistas y entre Entidades y Sociedades en este tema de enorme importancia sanitaria.